

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MIRELE LOPES DA SILVA

***Penicillium* sp. 658F5R-AM ENDOFÍTICO DE *Hevea brasiliensis*: ANOTAÇÃO
DO GENOMA, CONTROLE DE FITOPATÓGENOS, PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

VIÇOSA-MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586p
2024

Silva, Mirele Lopes da, 1993-
Penicillium sp. 658F5R-AM endofítico de *Hevea
brasiliensis*: anotação do genoma, controle de fitopatógenos,
promoção de crescimento vegetal e produção de metabólitos
secundários / Mirele Lopes da Silva. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (131 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marisa Viera de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.576>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Genoma. 3. Seringueira -
Doenças e pragas - Controle biológico. 4. Seringueira
- Crescimento. 5. Metabólitos secundários. I. Queiroz, Marisa
Viera de, 1964-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.5654

MIRELE LOPES DA SILVA

***Penicillium* sp. 658F5R-AM ENDOFÍTICO DE *Hevea brasiliensis*: ANOTAÇÃO
DO GENOMA, CONTROLE DE FITOPATÓGENOS, PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Maurício Dutra Costa

Pedro Marcus Pereira Vidigal

Colaborador: Gilvan Ferreira da Silva

VIÇOSA-MINAS GERAIS

2024


MIRELE LOPES DA SILVA

***Penicillium* sp. 658F5R-AM ENDOFÍTICO DE *Hevea brasiliensis*: ANOTAÇÃO
DO GENOMA, CONTROLE DE FITOPATÓGENOS, PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 24/08/2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 MIRELE LOPES DA SILVA
Data: 07/10/2024 19:02:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mirele Lopes da Silva

Autor

Documento assinado digitalmente
 MARISA VIEIRA DE QUEIROZ
Data: 08/10/2024 17:30:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marisa Vieira de Queiroz

Orientador

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho e por ser meu sustento diário. Aos meus pais, Divino e Mileide, por me apoiarem e incentivarem todos os dias e por me proporcionarem os melhores momentos da minha vida: esse título é para vocês e por vocês. Aos meus irmãos, Tiago e Mateus, pela irmandade e amizade, e, também, por acreditarem que eu poderia chegar aonde eu quisesse. À minha tia Maria, por ser minha segunda mãe e por me mostrar que independentemente de qualquer coisa, somos sempre capazes de conquistar o que almejamos. Às minhas amigas “Só as gatonas fodas!”, “Friends Forever” e minhas primas, Amanda, Cláudia e Karine, pela amizade sincera, por serem mulheres guerreiras e minha inspiração: amo muito vocês. Aos meus amigos “Tóxicos dos tóxicos” e ao Pedro, pela amizade, pelo convívio diário no laboratório, pelos conselhos, pelas farras e por sempre conseguirem arrancar sorrisos, tornando a jornada mais leve.

À minha orientadora Marisa, pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos e por ter acreditado que seria capaz de executar este trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e aos professores pela contribuição em minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001 e, também, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos demais que, de alguma forma, colaboraram com o meu trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

SILVA, Mirele Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. ***Penicillium* sp. 658F5R-AM endofítico de *Hevea brasiliensis*: anotação do genoma, controle de fitopatógenos, promoção de crescimento vegetal e produção de metabólitos secundários.** Orientador: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Maurício Dutra Costa e Pedro Marcus Pereira Vidigal

Estudos sobre os fungos endofíticos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Esse fato é justificado pela diversidade taxonômica, biológica e funcional desse grupo e, também, pela relevância ecológica e potencial para a produção de metabólitos secundários e moléculas bioativas com estruturas e funções biológicas diversas. *Penicillium* é fungo ascomiceto com muitos representantes e ecologicamente diverso, tendo sido relatado como tendo potencial para o controle biológico de fitopatógenos, para promoção do crescimento vegetal e para a produção de metabólitos secundários. Neste estudo, avaliou-se o potencial antagônico de *Penicillium* sp. contra oito fitopatógenos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Corynespora* sp., *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. graminicola*, *C. boninense*, *C. falcatum*, *C. gloeosporoides* e *C. acutatum*) em ensaios *in vitro*, e em feijão-comum contra *S. sclerotiorum* e *C. lindemuthianum* em casa de vegetação. *Penicillium* sp. foi capaz de reduzir significativamente o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* e *Corynespora* sp., além de diminuir em 91,9 % a área lesionada pela antracnose causada por *C. lindemuthianum* e o progresso da doença mofo-branco causada por *S. sclerotiorum*. Além da capacidade antagônica, *Penicillium* sp. demonstrou capacidade de solubilizar fosfato, de produzir amônia, ácido indol acético, giberelina, sideróforos, enzimas extracelulares e potencial para promover o crescimento do feijão-comum, aumentando a altura das plantas em 33,9 %, e o comprimento da raiz em 11,7 %. A massa seca da parte aérea apresentou aumento de 8,9 % e a da raiz em 7,8 %. A inoculação com o fungo melhorou a eficiência de utilização (P, N, Ca e Mg) e a eficiência de translocação de nutrientes (P e N). A análise do genoma de *Penicillium* sp. revelou tamanho de 35.637.581 pares de bases (pb), distribuídos em 20 *scaffolds*, com 11.300 genes preditos e uma completude genômica de 96,1%. Foram detectados quatro cromossomos por meio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). O genoma codifica 508 CAZymes, transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*), de glicose, maltose, colina, sideróforos, e permease de aminoácidos aromáticos e neutros, além de *clusters* de genes biossintéticos de metabólitos secundários. A identificação

química guiada por HRMS-MS mostrou a presença de 14 compostos, incluindo andrastinas, citreohibridonas, ácidos carboxílicos e peptídeos. Esses compostos pertencem a classes de moléculas conhecidas por apresentarem diversas atividades biológicas, como propriedades antifúngicas, antibacterianas e antitumorais. A identificação desses compostos destaca o potencial de *Penicillium* sp. como fonte de moléculas bioativas com aplicações farmacêuticas e agrícolas. A sequência completa do genoma mitocondrial de *Penicillium* sp. foi relatada pela primeira vez, apresentando 27.999 pb e codificando proteínas mitocondriais características. Comparado a outros *Penicillium*, o mtDNA de *Penicillium* sp. possui uma ordem genética única, embora compartilhe similaridade em tamanho e conteúdo genético. Este estudo forneceu uma compreensão detalhada do genoma (nuclear e mtDNA) e perfil químico de *Penicillium* sp. destacando seu potencial como agente de controle biológico de fitopatógenos e promotor de crescimento vegetal.

ABSTRACT

SILVA, Mirele Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2024. ***Penicillium* sp. 658F5R-AM endophyte from *Hevea brasiliensis*: genome annotation, phytopathogen control, plant growth promotion and secondary metabolite production.** Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-supervisors: Maurício Dutra Costa and Pedro Marcus Pereira Vidigal

Studies on endophytic fungi have increased considerably in recent years. This fact is justified by the taxonomic, biological and functional diversity of this group and also by the ecological relevance and potential for the production of secondary metabolites and bioactive molecules with diverse structures and biological functions. *Penicillium* is an ascomycete fungus with many representatives and ecologically diverse, having been reported as having potential for the biological control of phytopathogens, for the promotion of plant growth and for the production of secondary metabolites. In this study, the antagonistic potential of *Penicillium* sp. against eight phytopathogens (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Corynespora* sp., *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. graminicola*, *C. boninense*, *C. falcatum*, *C. gloeosporoides* and *C. acutatum*) was evaluated in in vitro assays, and in common beans against *S. sclerotiorum* and *C. lindemuthianum* in a greenhouse. *Penicillium* sp. was able to significantly reduce the mycelial growth of *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* and *Corynespora* sp., in addition to decreasing by 91.9% the area injured by anthracnose caused by *C. lindemuthianum* and the progression of white mold disease caused by *S. sclerotiorum*. In addition to its antagonistic capacity, *Penicillium* sp. demonstrated the ability to solubilize phosphate, produce ammonia, indole acetic acid, gibberellin, siderophores, extracellular enzymes and the potential to promote the growth of common bean, increasing plant height by 33.9% and root length by 11.7%. The dry mass of the aerial part increased by 8.9% and that of the root by 7.8%. Inoculation with the fungus improved the efficiency of use (P, N, Ca and Mg) and the efficiency of nutrient translocation (P and N). The analysis of the *Penicillium* sp. genome revealed a size of 35,637,581 base pairs (bp), distributed in 20 scaffolds, with 11,300 predicted genes and a genomic completeness of 96.1%. Four chromosomes were detected by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The genome encodes 508 CAZymes, MFS (Major Facilitator Superfamily) transporters of glucose, maltose, choline, siderophores, and permease of aromatic and neutral amino acids, in addition to biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. The chemical identification guided by HRMS-MS

showed the presence of 14 compounds, including andrastines, citreohybridones, carboxylic acids and peptides. These compounds belong to classes of molecules known to exhibit diverse biological activities, such as antifungal, antibacterial and antitumor properties. The identification of these compounds highlights the potential of *Penicillium* sp. as a source of bioactive molecules with pharmaceutical and agricultural applications. The complete mitochondrial genome sequence of *Penicillium* sp. was reported for the first time, presenting 27,999 bp and encoding characteristic mitochondrial proteins. Compared to other *Penicillium*, the mtDNA of *Penicillium* sp. has a unique gene order, although it shares similarity in size and gene content. This study provided a detailed understanding of the genome (nuclear and mtDNA) and chemical profile of *Penicillium* sp. highlighting its potential as a biological control agent of phytopathogens and plant growth promoter.

Sumário

Introdução Geral	11
Referências	14
Capítulo 1: <i>Penicillium</i> sp.: uma espécie amazônica com potencial para o biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento do feijão-comum	17
RESUMO.....	17
Introdução.....	18
Material e Métodos.....	19
Linhagens e condições de crescimento	19
Tolerância a cloreto de sódio e diferentes valores de pH	20
Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antagônico de <i>Penicillium</i> sp.....	20
Avaliação da atividade antagônica por meio de compostos difusíveis no meio de cultura	20
Avaliação da capacidade de inibir a germinação de conídios dos fitopatógenos	21
Avaliação da atividade antagônica por meio da produção de compostos orgânicos voláteis	21
Avaliação <i>in vivo</i> do potencial antagônico de <i>Penicillium</i> sp.....	21
Avaliação do controle da antracnose	21
Avaliação do controle do mofo-branco.....	22
Avaliação do potencial de <i>Penicillium</i> sp. em promover crescimento vegetal <i>in vitro</i>	23
Solubilização de fosfato inorgânico.....	23
Produção de amônia.....	23
Produção de sideróforos.....	24
Produção de ácido indol acético	24
Produção de giberelina.....	24
Atividade de CMCase	25
Atividade de amilase.....	25
Atividade de protease.....	25
Atividade de pectinase	26
Atividade de lipase.....	26
Transformação de <i>Penicillium</i> sp. com o plasmídeo pPGW-HpH-RFP	26
Colonização de <i>Penicillium</i> sp. em plantas de feijão-comum	27
Avaliação da promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i>	28

Análise estatística.....	29
Resultados.....	29
Tolerância a cloreto de sódio e diferentes valores de pH	29
Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antagônico de <i>Penicillium</i> sp.....	30
Avaliação da atividade antagônica por meio de compostos difusíveis no meio de cultura	30
Avaliação da inibição da germinação de conídios dos fitopatógenos por metabólitos produzidos por <i>Penicillium</i> sp.	32
Avaliação da atividade antagônica por meio da produção de compostos orgânicos voláteis	33
Avaliação <i>in vivo</i> do potencial antagônico de <i>Penicillium</i> sp.....	35
Avaliação do controle da antracnose	35
Avaliação do controle do mofo-branco.....	36
Avaliação da promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	37
Colonização de <i>Penicillium</i> sp. em plantas de feijão-comum	37
Avaliação da promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i>	39
Discussão	45
Conclusão	48
Referência.....	49
Material Suplementar	54
Capítulo 2: Desvendando o genoma e os metabólitos secundários produzidos por <i>Penicillium</i> sp. endofítico de <i>Hevea brasiliensis</i> (seringueira) da floresta amazônica brasileira.....	56
RESUMO.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	59
Isolado de fungo, sequenciamento de DNA e montagem completa do genoma	59
Preparação de DNA cromossômico intacto e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	60
Extração de metabólitos secundários secretados em meio líquido	62
Extração de metabólitos secundários secretados em meio sólido em cultura dupla... ..	62
Análise HPLC-HRMS	63
Desreplicação via GNPS	63
Desreplicação manual	64
Resultados.....	64

Características gerais do genoma.....	64
Enzimas ativas em carboidratos (CAZymes).....	67
Mineração genômica.....	68
Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	70
Identificação e anotação dos metabólitos secundários de <i>Penicillium</i> sp.....	71
Discussão	77
Conclusão	83
Referências	85
Material Suplementar	95
Capítulo 3: Comparative analysis and complete sequence of the mitochondrial genome of <i>Penicillium</i> sp. endophytic fungus of <i>Hevea brasiliensis</i> (rubber tree).	107
ABSTRACT	107
Introduction	108
Materials and methods.....	110
Fungal isolate, DNA sequencing, and mitochondrial genome assembly.....	110
Annotation and analysis of the <i>Penicillium</i> sp. mitochondrial genome.....	111
Comparative genomics and phylogenetic analysis	111
Results	112
Genomic features of the <i>Penicillium</i> sp. mitochondrial genome.....	112
Comparative Analyses	117
Discussion.....	120
Conclusion.....	122
Referências	124
Material Suplementar	129
Conclusões Gerais.....	131

Introdução Geral

A floresta amazônica é constituída por um rico arranjo de biodiversidade vegetal, animal e microbioma. Dentre os microrganismos, destacam-se os endofíticos que habitam o interior das plantas. Entre as espécies de destaque da flora, encontram-se as seringueiras (*Hevea* spp.) que se destacam por serem de grande interesse econômico para o Brasil. A espécie *Hevea brasiliensis*, por exemplo, é a mais cultivada comercialmente, sendo fonte de matéria prima para a produção de borracha natural (Gasparotto et al., 2012) com aplicações no setor industrial e de transporte. Entre os microrganismos associados às plantas, os fungos endofíticos têm sido alvo de diferentes estudos em razão da alta diversidade taxonômica, biológica e funcional desses microrganismos.

Fungos endofíticos são aqueles que se encontram no interior dos tecidos das plantas por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida sem causar danos aparentes. Encontram-se distribuídos por diferentes órgãos e tecidos, tais como folhas, ramos, caules, raízes (Petrini, 1991). Os fungos endofíticos permaneceram negligenciados até recentemente, quando muitos estudos tornaram evidentes a relevância ecológica e o potencial de produção de metabólitos secundários com funções biológicas diversificadas por esses microrganismos. Além disso, podem atuar como agentes de controle de diversas doenças e na promoção do crescimento de culturas de importância econômica (Toghueo et al., 2020).

Existem diversos estudos que relatam a capacidade de fungos endofíticos de estimular o crescimento das plantas ou aumentar a resistência natural delas aos estresses bióticos e abióticos. São inúmeros os benefícios da colonização de plantas por fungos endofíticos, e esses são diferenciados em mecanismos diretos e mecanismos indiretos de promoção de crescimento. Dentre os mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal, os mais importantes são os envolvidos com o aumento da aquisição de nutrientes e a produção de fitohormônios. Já entre os mecanismos indiretos, destacam-se a indução de tolerância a estresses bióticos e abióticos, incluindo o antagonismo a patógenos e pragas (Baron e Rigobelo, 2022).

Dentre os diferentes grupos de fungos endofíticos, as espécies do gênero *Penicillium* têm sido estudados e relatadas na literatura. *Penicillium* é um gênero de grande importância, com cerca de 483 espécies, divididas em 26 seções (Pitt et al., 2000; Visagie

et al., 2014), sendo que esse número aumenta constantemente como novas espécies descritas. Araújo et al. (2018) isolaram e analisaram a diversidade de fungos endofíticos de folhas, caules e raízes de árvores de *Hevea brasiliensis* da floresta amazônica brasileira. Dentre os fungos isolados, *Penicillium* sp. foi identificado e se destacou pelo potencial de produção de metabólitos de interesse para a indústria e para o desenvolvimento sustentável do agronegócio.

As espécies de *Penicillium* spp. são conhecidas por serem produtores de metabólitos secundários com diferentes estruturas, incluindo policetídeos, peptídeos não ribossômicos, terpenóides e alcaloides, que apresentam diversas atividades biológicas (Zang et al., 2021). Novos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos filamentosos, como as espécies do gênero *Penicillium*, tem sido continuamente descobertos. No entanto, a maioria dos estudos de bioprospecção de moléculas bioativas e de metabólitos secundários são feitos a partir de observações fenotípicas, e se concentram no isolamento e caracterização desses compostos. No entanto, estratégias baseadas em anotação do genoma e genética surgiram como abordagens abrangentes para estudar melhor esses fungos e também as moléculas bioativas, sendo consequentemente, possível explorar o potencial dos microrganismos produtores (Sagita et al., 2021).

Com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento, o custo de sequenciamento e o tempo de resposta reduzidos permitiram que houvessem estudos comparativos dos genomas. De modo geral, os genomas de espécies de *Penicillium* anteriormente estudados apresentaram tamanhos variando de 25 Mb a 36 Mb (Julca et al., 2016; Fisher et al., 2022) e, geralmente, possuem de quatro a oito cromossomos (Teixeira et al., 2014; Pham et al., 2023), com conteúdo GC variando de 45,1 % a 50,61 % (Fisher et al., 2022; Gauthier et al., 2023). Além disso, informações adquiridas do mtDNA, como conteúdo, arranjo gênico e estrutura exon-íntron, bem como filogenia molecular baseada em sequências de proteínas mitocondriais simples ou concatenadas, aumentaram nosso conhecimento sobre *Penicillium* (Sun et al., 2011; Woo et al., 2003).

Na agricultura, o gênero *Penicillium* é de grande importância por várias espécies serem capazes de promover o crescimento vegetal em diversas culturas como o trigo (Bhatt et al., 2016), o pepino (Babu et al., 2015), o milho (Galeano et al., 2023) e o arroz (Khan et al., 2008); controlar doenças causadas por diversos fitopatógenos, tais como *Phytophthora* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium* spp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea* (Ma et al., 2008; Wang et

al., 2010; Yuan et al., 2017; Toghueo et al., 2020; Rojas et al., 2022); controlar pragas em diversas culturas, ou insetos que atuam como agentes transmissores (Babu et al., 2018); reduzir a poluição por resíduos de pesticidas químicos e metálicos (Khan e Lee, 2013) e induzir resistência em plantas (Hossain et al., 2007; Rojas et al., 2022).

No feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), uma importante cultura para o Brasil e para o Estado de Minas Gerais, existe uma série de doenças causadas por fungos que prejudicam a produção. Entre essas doenças estão a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Bianchini et al., 2005), e estas doenças estão relacionadas com as perdas das lavouras e com a baixa produtividade. O aumento de produção não pode ser baseado somente no aumento da área cultivada, e sim no aumento de produtividade agrícola, que é dependente do uso de fertilizantes minerais e agentes químicos para o controle de doenças e insumos que causam uma série de impactos negativos, tanto ambientais quanto econômicos (Horrihan et al., 2002).

Nesse contexto, a elevação dos níveis de produtividade e redução dos custos de produção tem aumentado o interesse em pesquisas que explorem o potencial tecnológico de microrganismos que possam trazer benefícios, a exemplo do controle de fitopatógenos e a promoção de crescimento das plantas. A busca por soluções sustentáveis impulsiona o interesse em agentes biológicos, destacando-se o potencial dos fungos endofíticos do gênero *Penicillium* nesse cenário. Entender interações do fungo com as plantas e patógenos, juntamente com os avanços tecnológicos, como o sequenciamento e o arsenal químico, abrirá novas oportunidades para a utilização eficiente desses microrganismos na agricultura.

Referências

- Araújo KS, Brito VN, Veloso TGR, Leite TS, Pereira OL, Mizubuti ESG, Queiroz MV (2018). Diversity of culturable endophytic fungi of *Hevea guianensis*: A latex producer native tree from the Brazilian Amazon. *African Journal of Microbiology Research*, 12(42):953–964. <https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8980>.
- Babu AG, Kim SW, Yadav DR, Hyum U, Adhikari M, Lee YS (2015). *Penicillium menonorum*: A Novel fungus to promote growth and Nutrient Management in Cucumber Plants. *Mycobiology*, 43(1):49-56. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.1.49>.
- Babu JV, Popay AJ, Miles CO, Wilkins AL, Menna ME, Finch SC (2018). Identification and structure elucidation of Janthitrems A and D from *Penicillium janthinellum* and determination of the Tremorgenic and anti-insect activity of Janthitrems A and B. *Journal Agricultural Food Chemistry* 66(50):13116–13125.
- Baron NC, Rigobelo EC (2022). Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, 13(1):39–55. <https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699>.
- Bhatt SC, Debnath S, Pareek N (2016). Assessment of *Penicillium bilaii* inoculation in wheat (*Triticum aestivum* L.) for improving growth, yield and phosphorus availability in Mollisols of India. *Journal of Applied and Natural Science*, 8(1): 358–367. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.800>.
- Bianchini A, Marangoni AC, Carneiro SMTPG. 2005. Manual de Fitopatologia: Doenças em plantas cultivadas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. São Paulo: Ceres 663p.
- Fisher S, Villers D, Plessis MD, Hattingh K, Saulse C, Basson G, Barker A, Daniel AI, Al-Hashimi A, Hitzeroth A, Makhalanyane T, Mavumengwana V, Gokul A, Keyster M, Klein A (2022). Draft Whole-Genome Sequence of *Penicillium simplicissimum* A4, a Putative Endophyte from *Echium plantagineum*. *Microbiology Resource Announcements*, 11:e0085422. <https://doi.org/10.1128/mra.00854-22>.
- Galeano RMS, Silva SM, Yonekawa MKA, Guimarães NCA, Giannesi GC, Masui DC, Corrêa BO, Brasil MS, Zanoelo FF. (2023). *Penicillium chrysogenum* strain 34-P promotes plant growth and improves initial development of maize under saline conditions. *Rhizosphere* 26: 2452-2198. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100710>.
- Gasparotto L, Figueredo AS, Rezende JCP, Alves FF (2012). Doenças da seringueira no Brasil. Embrapa. Brasília, Brasil.
- Gauthier J, Mohammadi S, Huffman J, Lawal OU, Kulkavica-Ibrulj I, Potvin M, Goodridge L, Levesque RC (2023). Complete genome sequences of agricultural azole-resistant *Penicillium rubens* encoding CYP51A and ERG11 paralogues. *Microbiology Resource Announcements*, 12:e00188-23. <https://doi.org/10.1128/MRA.00188-23>.

- Horrigan L, Lawrence RS, Walker P (2002). How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 110(5):455-456. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110445>.
- Hossain DM, Sultana F, Kubota M, Koyama H, Hyakumachi M (2007). The Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 Induces Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Activation of Multiple Defense Signals. *Plant and Cell Physiology*, 48(12):1724-1736. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm144>.
- Julca I, Droby S, Sela N, Marcet-Houben M, Gabaldón T (2016). Contrasting Genomic Diversity in Two Closely Related Postharvest Pathogens: *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. *Genome Biology and Evolution*, 8(1):218–227. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv252>.
- Khan AL, Lee IJ (2013). Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. *BMC Plant Biology* 13:86. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-86>.
- Khan S, Hamayun M, Yoon H, Kim H-Y, Suh S-J, Hwang S-K, Kim J-M, Lee I-J, Choo Y-S, Kong W-S, Lee B-M, Kim J-G (2008). Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology* 8:231. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-231>.
- Ma Y, Chang ZZ, Zhao JT, Zhou MG (2008). Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper. *Biological Control* 44(1): 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.005>.
- Petrini O (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds) *Microbial Ecology of Leaves*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9.
- Pham HM, Le DT, Le LT, Chu PTM, Tran LH, Pham TT, Nguyen HM, Luu TT, Hoang H, Chu HH (2023). A highly quality genome sequence of *Penicillium oxalicum* species isolated from the root of *Ixora chinensis* in Vietnam. *G3 (Bethesda)*, 13(2). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac300>.
- Pitt JI, Samson RA (2000). Types of *Aspergillus* and *Penicillium* and their teleomorphs in current use. In: Samson RA, Pitt JI (eds) *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus* Classific. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 51-72.
- Rojas EC, Jensen B, Jorgensen HJL, Latz MAC, Esteban P, Collinge DB (2022). The Fungal Endophyte *Penicillium olsonii* ML37 Reduces Fusarium Head Blight by Induced Resistance in Wheat Spikes. *Journal of Fungi*, 8(4):345. <https://doi.org/10.3390/jof8040345>.
- Sagita R, Quax WJ, Haslinger K (2021). Current State and Future Directions of Genetics and Genomics of Endophytic Fungi for Bioprospecting Efforts. *Bioengineering and Biotechnology*, 6:649906. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.649906>.
- Sun X, Li H, Yu D (2011). Complete mitochondrial genome sequence of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum* and comparative analysis of closely related species. *FEMS Microbiology Letters*, 323(1):29–34.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02358.x>.

- Teixeira JA, Nogueira GB, Queiroz MV, Araújo EF (2014). Genome organization and assessment of high copy number and increased expression of pectinolytic genes from *Penicillium griseoroseum*: a potential heterologous system for protein production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 1571–1580. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1486-4>.
- Toghueo RMK, Boyom FF (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3Biotech*, 10:107. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong S-B, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 63–139. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- Wang Y, Wang G, Wang L, Xu X, Xia J, Huang X, Wu Y, Zhang C (2010). Isolation and identification of an endophytic fungus of *Polygonatum cyrtonema* and its antifungal metabolites. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50(8):1036–1043.
- Woo PCY, Zhen H, Cai JJ, Yu J, Lau SKP, Wang J, Teng JLL, Wong SSY, Tse RH, Chen R, Yang H, Liu B, Yuen KY (2003). The mitochondrial genome of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is more closely related to those of molds than yeasts. *FEBS Letters*, 555(3):469–477. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01307-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01307-3).
- Yuan Y, Feng H, Wang L, Li Z, Shi Y, Zhao L, Feng Z, Zhu H (2017). Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against *Verticillium* Wilt disease. *PLoS One* 12(1):e0170557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170557>.
- Zang Y, Gong Y, Chen X, Wen H, Qi C, Chen C, Liu J, Luo Z, Wang J, Zhu H, Zhang Y (2021). Piperazine-2,5-dione derivatives and an α -pyrone polyketide from *Penicillium griseofulvum* and their immunosuppression activity. *Phytochemistry*, 186:112708. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112708>.

Capítulo 1: *Penicillium* sp.: uma espécie amazônica com potencial para o biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento do feijão-comum

RESUMO

Fungos endofíticos do gênero *Penicillium* têm recebido destaque em função da capacidade de produzir compostos bioativos com funções biológicas diversificadas, inclusive com aplicabilidade na agricultura. Nesse estudo, foi avaliado o potencial antagonico de *Penicillium* sp. a oito fitopatógenos (*S. sclerotiorum*, *Corynespora* sp., *C. lindemuthianum*, *C. graminicola*, *C. boninense*, *C. falcatum*, *C. gloesporeoides* e *C. acutatum*) em ensaios *in vitro*, e em casa de vegetação a *S. sclerotiorum* e *C. lindemuthianum* em feijão-comum. Além disso, foi avaliada a capacidade de *Penicillium* sp. promover o crescimento do feijão-comum. *Penicillium* sp. foi capaz de reduzir o crescimento micelial *in vitro* de *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* e *Corynespora* sp. de forma significativa e apresentou eficácia na redução da área lesionada (91,9 %) pela antracnose provocada por *C. lindemuthianum* e no progresso da doença mofo-branco provocada por *S. sclerotiorum* em casa de vegetação. As análises realizadas demonstraram que *Penicillium* sp. produz amônia, ácido indol acético, giberelina, sideróforos, enzimas extracelulares e pode solubilizar fosfato, demonstrando potencial para promoção de crescimento vegetal. Esse potencial foi confirmado pelos testes realizados em feijão-comum, em que o tratamento com *Penicillium* sp. promoveu o aumento da altura da parte aérea (33,9 %) e o comprimento da raiz (11,7 %), a massa seca da parte aérea (8,9 %) e da raiz (7,8 %) e também o aumento do conteúdo de macro e micronutrientes e da eficiência de utilização de P, N, Ca e Mg e de translocação de N e P. Portanto, *Penicillium* sp. é promotor de crescimento do feijão-comum e um potencial agente de controle biológico de fitopatógenos.

Palavras-chave: *Penicillium* sp. 658F5R-AM, endofítico, biocontrole, promoção de crescimento vegetal.

Introdução

A floresta amazônica constitui manancial internacionalmente reconhecido de biodiversidade vegetal, animal e microbiana. Dentre os microorganismos destacam-se os endófitos que vivem no interior dos tecidos vegetais sem causar danos aparentes. Já em relação às espécies vegetais, encontram-se as seringueiras (*Hevea* spp.), que se destacam por serem de grande interesse econômico para o Brasil, principalmente a *Hevea brasiliensis*, cultivada comercialmente como fonte de matéria prima para a produção de borracha natural (Gasparotto et al., 2012). Entre os microrganismos associados às plantas, os fungos endofíticos têm sido alvo de diferentes estudos em razão da alta diversidade taxonômica, bioquímica e funcional. Fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior dos tecidos das plantas durante, pelo menos, uma parte do seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes. Encontram-se distribuídos por diferentes órgãos e tecidos das plantas, tais como folhas, ramos, caules, raízes (Petrini, 1991). Os fungos endofíticos são de grande relevância ecológica e demonstram potencial de produção de metabólitos secundários com funções biológicas diversificadas, podendo atuar como agentes de controle de diversas doenças e na promoção do crescimento de culturas de grande importância econômica para o país (Toghueo et al., 2020).

Dentre os diferentes grupos de fungos endofíticos, as espécies do gênero *Penicillium* têm sido estudadas e relatadas na literatura (Toghueo et al., 2020). *Penicillium* é um gênero de grande importância, com cerca de 483 espécies, divididas em 26 seções (Pitt et al., 2000; Visagie et al., 2014). Esse número aumenta constantemente à medida em que novas espécies vão sendo descritas. As espécies de *Penicillium* possuem potencial para aplicação nas mais diversas áreas, e estudos vêm sendo realizados com o objetivo de descobrir novos compostos bioativos a partir de espécies de *Penicillium* com potencial biotecnológico, farmacêutico e de uso nos sistemas agrícolas (Toghueo et al., 2020). Na agricultura, o gênero *Penicillium* é de grande importância por diferentes espécies serem capazes de promover o crescimento vegetal em diversas culturas, como o trigo (Bhatt et al., 2016), o pepino (Babu et al., 2015), o milho (Galeano et al., 2023) e o arroz (Khan et al., 2008); controlar doenças causadas por diversos fitopatógenos, tais como *Phytophthora* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium* spp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*,

Rhizoctonia solani e *Botrytis cinerea* (Ma et al., 2008; Wang et al., 2010; Yuan et al., 2017; Toghueo et al., 2020; Rojas et al., 2022); controlar pragas em diversas culturas, ou insetos que atuam como agentes transmissores de doenças (Babu et al., 2018); reduzir a poluição ocasionada por pesticidas químicos e metais (Khan e Lee, 2013) e induzir resistência em plantas (Hossain et al., 2007; Rojas et al., 2022).

Araújo et al. (2018) isolaram e analisaram a diversidade de fungos endofíticos de folhas, caules e raízes de árvores de *Hevea brasiliensis* da floresta amazônica brasileira. Dentre os fungos isolados, *Penicillium* sp. foi identificado e se destacou pelo potencial de produção de metabólitos de interesse para a indústria e para o desenvolvimento sustentável do agronegócio. Portanto, nesse estudo foi analisada a capacidade de *Penicillium* sp. de controlar fitopatógenos do feijão-comum e de promover o crescimento vegetal.

Material e Métodos

Linhagens e condições de crescimento

Penicillium sp. 658F5R-AM foi obtido de seringueira (*Hevea brasiliensis*) da Floresta Amazônica brasileira (Araújo et al., 2018) e depositado na coleção do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (LGMM) da Universidade Federal de Viçosa. *Penicillium* sp. foi cultivado em meio BDA (batata 200 g.L⁻¹; dextrose 20 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹) durante 7 dias a 28 °C.

Os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* Ss 15B, *Colletotrichum lindemuthianum* A₂ 2-3 e *Colletotrichum graminicola* 50.09 também foram obtidos da coleção do LGMM. O fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi cultivado em meio BDA durante 7 dias a 25 °C, o *C. lindemuthianum* foi cultivado em meio YMC (extrato de malte 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 2 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹) por 7 dias a 22°C com fotoperíodo de 12 h e o *C. graminicola* foi cultivado em meio BDA por 7 dias a 22°C com fotoperíodo de 12 h.

Os fitopatógenos *Colletotrichum acutatum* UFVC47MT, *Colletotrichum boninense* UFVC1MG, *Colletotrichum gloeosporioides* UFVC5BA e *Corynespora* sp. Cory3 foram cedidos pelo professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos da UFV e o fitopatógeno *Colletotrichum*

falcatum CF2 foi cedido pela professora Maria Catarina Megumi Kasuya do Laboratório de Associações Micorrízicas da UFV. Os fitopatógenos *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. gloeosporioides* e *C. falcatum* foram cultivados em meio BDA a 22°C com fotoperíodo de 12 h e o *Corynespora* sp. foi cultivado em meio BDA a 28°C.

Tolerância a cloreto de sódio e diferentes valores de pH

Penicillium sp. foi testado em três repetições biológicas e experimentais em placas contendo meio BDA sem cloreto de sódio (NaCl) e em diferentes concentrações de NaCl (p/v): 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 10; 15; 20 e 25%. Para avaliar a tolerância a diferentes valores de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0), o meio BDA foi ajustado conforme os valores e foram inoculados discos de micélio de 5 mm do fungo cultivado durante 7 dias a 28 °C. Após a inoculação dos discos de micélio, as placas foram incubadas por 7 dias a 28 °C, e o resultado foi avaliado por medida do diâmetro da colônia de crescimento (Zhang et al., 2019).

Avaliação *in vitro* do potencial antagônico de *Penicillium* sp.

Avaliação da atividade antagônica por meio de compostos difusíveis no meio de cultura

O potencial antagonista de *Penicillium* sp. foi avaliado usando o método de cultura dupla (Dennis e Webster, 1971). Um disco de micélio de 5 mm de diâmetro de *Penicillium* sp. foi inoculado em um lado da placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura BDA. Em seguida, no lado oposto, foi inoculado o fungo fitopatogênico. Como controle, foi avaliado o crescimento do fungo fitopatogênico sem a inoculação prévia de *Penicillium* sp. As culturas foram incubadas de acordo com as condições de cultivo de cada um dos fitopatógenos, e o ensaio foi realizado em três repetições biológicas e experimentais.

A porcentagem de inibição do crescimento do fitopatógeno (IC) foi calculado usando a fórmula:

$$IC = [(C - T) / (C)] \times 100 \%$$

Onde *C* é o diâmetro da colônia do fungo no controle (sem inoculação prévia de *Penicillium* sp.) e *T* é o diâmetro do crescimento micelial do tratamento (inoculação prévia de *Penicillium* sp.).

Avaliação da capacidade de inibir a germinação de conídios dos fitopatógenos

A avaliação do potencial de *Penicillium* sp. em inibir a germinação dos conídios dos fitopatógenos foi realizada pela adição do filtrado livre de células ao meio de cultura (Li et al., 2019). *Penicillium* sp. foi inoculado em caldo de BD a uma concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹. A cultura foi incubada a 28 °C com agitação a 180 rpm durante 7 dias e depois filtrada através de uma membrana de 0,22 µm para obter o filtrado de cultura livre de células. O filtrado foi misturado com BDA estéril (1:1 v/v). Em seguida, a mistura foi despejada em placas de Petri. Depois que as placas foram resfriadas, uma suspensão contendo aproximadamente 100 conídios do fitopatógeno foi espalhada sobre a superfície. Para o controle, o filtrado foi substituído por BD estéril. As culturas foram incubadas de acordo com as condições de cultivo de cada um dos fitopatógenos, e o ensaio foi realizado em três repetições biológicas e experimentais.

Avaliação da atividade antagônica por meio da produção de compostos orgânicos voláteis

A avaliação foi realizada usando o método de placa selada (Fernando et al., 2005). Em uma placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura BDA foi inoculado *Penicillium* sp., e em outra placa de Petri contendo 20 mL de meio BDA, o fitopatógeno. A placa contendo o patógeno, sem a tampa, foi invertida sobre a placa onde foi inoculada o *Penicillium* sp., também sem a tampa, e posteriormente, essas placas foram seladas com Parafilm®. As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. Como controle, foi utilizado o mesmo procedimento, sem a inoculação do *Penicillium* sp. O experimento foi conduzido em três repetições biológicas e experimentais e o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi realizado conforme descrito anteriormente.

Avaliação *in vivo* do potencial antagônico de *Penicillium* sp.

Avaliação do controle da antracnose

Sementes desinfestadas com álcool 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio 0,5% por 5 minutos, e lavadas por 3 vezes com água destilada estéril, foram transferidas para vasos de 0,5 L contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças® e quando atingiram o estágio V1, foi inoculada uma suspensão de conídios de *Penicillium* sp. na concentração 1×10^7 conídios.mL⁻¹ nas faces abaxial e adaxial das folhas. Após 24 h, o patógeno foi

inoculado pelo método de aspersão. Foi preparada uma suspensão com concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ e aplicada nas faces abaxial e adaxial das folhas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 12 h em câmara de inoculação na ausência de luz (escuro) e em seguida distribuídas totalmente ao acaso (DIC) em bancadas na casa de vegetação.

A severidade da doença foi avaliada 5 dias após a inoculação do patógeno, em duas folhas por planta, pela quantificação da área foliar lesionada por meio do programa Quant V 1.0 (Vale et al., 2001), expressando a severidade da doença em percentagem de área lesionada. Foram realizados quatro tratamentos: 1. Controle negativo (Plantas tratadas com água destilada), 2. Controle positivo (Plantas tratadas somente com o patógeno), 3. Plantas tratadas apenas com *Penicillium* sp.; 4. Plantas tratadas com *Penicillium* sp. e o patógeno. Foram realizadas 10 repetições biológicas e três repetições experimentais.

Avaliação do controle do mofo-branco

Sementes desinfestadas foram transferidas para vasos de 0,5 L contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças® e quando atingiram o estágio V1, foi inoculada uma suspensão de conídios de *Penicillium* sp. na concentração 1×10^7 conídios.mL⁻¹ nas faces abaxial e adaxial das folhas. Após 24 h, o patógeno foi inoculado. Para inoculação, um disco de micélio de 5 mm de *S. sclerotiorum* foi depositado sobre a nervura da folha, e as plantas foram avaliadas por sete dias consecutivos, por meio de escala de notas, que se baseia na intensidade e comprimento da lesão, descritas por Tôledo-Souza e Costa (2003). Com os dados da severidade foi calculado o índice de doença (ID) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Foram realizados quatro tratamentos: 1. Controle negativo (Plantas tratadas com água destilada), 2. Controle positivo (Plantas tratadas somente com o patógeno), 3. Plantas tratadas com *Penicillium* sp. e 4. Plantas tratadas com *Penicillium* sp. e o patógeno. Foram realizadas 10 repetições biológicas e três repetições experimentais. O ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições experimentais.

Fórmula para o cálculo do AACPD:

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(Y_{i+1} + Y_i)}{2} \right] [X_{i+1} + X_i]$$

Sendo:

- Y_i : Severidade da doença (nota por parcela em %) na i -ésima observação;
- Y_{i+1} : Severidade da doença na época da avaliação $i+1$;
- X_i : tempo (dias) na i -ésima observação;
- X_{i+1} : época da avaliação $i+1$;
- n : número total de observações.

A área abaixo da curva foi feita através do software R V.4.3.2 (Venables e Smith, 2009).

Avaliação do potencial de *Penicillium* sp. em promover crescimento vegetal *in vitro*

Solubilização de fosfato inorgânico

Disco de micélio de 5 mm de *Penicillium* sp. foi inoculado no centro das placas de Petri contendo 20 ml de meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium) [glicose 10 g.L⁻¹, Ca₃(PO₄)₂ 5 g.L⁻¹, MgCl₂.6H₂O 5 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,25 g.L⁻¹, KCl 0,2 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g.L⁻¹, ágar 18 g.L⁻¹] e incubadas por 7 dias a 28 °C (Nautiyal, 1999). O resultado positivo para a solubilização de fosfato foi indicado pela formação de halo ao redor da colônia fúngica.

Produção de amônia

Uma alíquota de 100 uL da suspensão de conídios (1x10⁶ conídios.mL⁻¹) de *Penicillium* sp. foi transferida para 25 mL de água peptonada a 1%, e a cultura foi incubada a 28 °C por 7 dias com agitação a 120 rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos, e uma alíquota do sobrenadante foi misturada ao reagente Nessler [10 % Hg₂I; 7 % KI; solução aquosa de NaOH a 50 % (32 %)] na proporção 1:1. O reagente Nessler foi capaz de detectar a presença de nitrogênio

amoniacoal, formando um precipitado amarelo-acastanhado, indicando resultado positivo para produção de amônia (Cappuccino e Sherman, 1992; Dey et al., 2004).

Produção de sideróforos

Foi utilizado uma adaptação do método descrito por Schwyn e Neilands (1987), empregando o meio CAS (Chrome Azurol S Agar Assay). Inicialmente, um disco de micélio de 5 mm de *Penicillium* sp. foi inoculado no centro de placas de Petri contendo 20 mL de BDA e incubadas à 28 °C por 4 dias. Após esse período, foram vertidos sobre as placas 10 mL de meio CAS/PIPES:

Meio CAS: 6 mg de CAS em 5 ml de água destilada, 1 ml de solução de Ferro III (1 mM FeCl₃.6H₂O em 10 mM HCl) completado para 10 mL com 7,3 mg de brometo de cetiltrimetilamônio (HDTMA) previamente dissolvido em 4 mL de água destilada;

Meio PIPES: PIPES 30,24 g.L⁻¹, ágar 9,0 g.L⁻¹; (os meios foram autoclavados separadamente).

Depois de esterilizados, foram adicionados 10 mL do meio CAS a 90 mL do meio PIPES. Posteriormente, as placas foram incubadas nas mesmas condições por mais 24h. A produção de sideróforos foi indicada pela presença de halo na cor laranja.

Produção de ácido indol acético

A produção de ácido indol acético (AIA) foi testada usando um protocolo modificado de Gordon e Weber (1951). Uma alíquota de 100 µL da suspensão de conídios (1x10⁶ conídios.mL⁻¹) de *Penicillium* sp. foi inoculada em Erlenmeyer com 50 ml de BD suplementado com 0,1 % de L-triptofano. Após o período de incubação de 7 dias a 28 °C, o meio foi filtrado e testado quanto à presença de IAA usando reagente Salkowski (50 ml de ácido perclórico 35% e 1 ml de FeCl₃ 0,5M). Quantidade igual do reagente foi misturada com o filtrado e incubada no escuro por 30 minutos. O resultado positivo para produção de AIA foi indicado pela presença de coloração rosa.

Produção de giberelina

Foi inoculado 1 mL da suspensão de conídios na concentração de 1x10⁷ conídios.mL⁻¹ de *Penicillium* sp. em Erlenmeyer contendo 100 mL do meio MCE (glicose

80 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,45 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 5 g.L⁻¹, NH₄NO₃ 1,85 g.L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 0,2 g.L⁻¹, ZnSO₄ 7H₂O, 0,2 g.L⁻¹, CaCl₂.2H₂O 0,1 g.L⁻¹, CuSO₄ 0,02 g.L⁻¹, CoCl₂ 0,02 g.L⁻¹, Na₂B₄O₇.10H₂O 0,02 g.L⁻¹, Na₂MoO₄.2H₂O 0,02 g.L⁻¹, MnSO₄.H₂O 0,02 g.L⁻¹, etilendiaminotetraacético 0,6 g.L⁻¹). Os Erlenmeyer foram colocados em shaker com agitação constante de 100 rpm, a 28 °C por 7 dias.

Após a incubação, o meio foi filtrado em gaze e posteriormente em membrana com poro de 0,45 µm de diâmetro. O pH do filtrado foi ajustado para 2,0 com HCl 1M e colocado em funil de separação. Para cada 50 mL do filtrado foi adicionado 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi coletada e seca no rotaevaporador. O pó remanescente no balão foi ressuspendido com acetonitrila e armazenado em frascos vial. Para a determinação da produção e quantificação do ácido giberélico foi utilizada a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (Bhalla et al., 2010).

Atividade de CMCase

Disco de micélio de 5 mm de *Penicillium* sp. foi inoculado no centro de placa de Petri contendo 20 mL de meio ágar CMC [meio de sal mínimo suplementado com 0,2% de carboximetilcelulose (CMC), 1,5% de ágar] e a placa foi colocada a 28 °C por 7 dias. Após esse período, uma solução de Vermelho Congo 0,5% foi adicionado à superfície das placas por 40 min e em seguida, uma solução descorante de NaCl 1M por 20 minutos, e o aparecimento de um halo em torno da colônia fúngica indicou resultado positivo para produção de CMCase (Mayende et al., 2006).

Atividade de amilase

Disco de micélio de 5 mm de *Penicillium* sp. foi inoculado no centro das placas de Petri contendo 20 mL de meio ágar nutriente suplementado com 0,5% de amido solúvel e a placa foi colocada a 28°C por 7 dias. Solução de iodo (0,3 g.L⁻¹ de iodo e 0,6 g.L⁻¹ de KI) foi adicionada na superfície das placas de Petri, e a formação de um halo claro ao redor da colônia fúngica indicou resultado positivo para a produção de amilase (Slama et al., 2019).

Atividade de protease

Disco de micélio de 5 mm de *Penicillium* sp. foi inoculado no centro de Petri contendo 20 ml de meio ágar leite desnatado (15 g.L⁻¹ de ágar e 10 g.L⁻¹ de leite em pó

desnatado) e esta foi colocada a 28 °C por 7 dias. Um halo ao redor da colônia indicou a atividade de protease (Loper e Schroth, 2008).

Atividade de pectinase

Disco de micélio de 5 mm de *Penicillium* sp. foi inoculado no centro de placa de Petri contendo 20 ml de meio mínimo pectina, contendo pectina cítrica em sua composição (pectina 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹ e ágar 15 g.L⁻¹) e a placa foi colocada a 28°C por 2 dias. Solução de iodo (0,3 g.L⁻¹ de iodo e 0,6 g.L⁻¹ de KI) foi adicionada na superfície da placa de Petri, e a formação de um halo claro ao redor da colônia fúngica indicou resultado positivo para a produção de pectinase (Salehghamari et al., 2019).

Atividade de lipase

Disco de micélio de 5 mm de *Penicillium* sp. foi inoculado no centro de placa de Petri contendo 20 ml de meio [10 g/L de peptona, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 0,2 g.L⁻¹ de CaCl₂, 1 % (v/v) de tween 80 e 15 g.L⁻¹ de ágar]. A placa foi incubada a 28 °C por 7 dias. A formação de um halo ao redor da colônia fúngica indicou atividade positiva para lipase (Tom e Crisan, 1975).

Transformação de *Penicillium* sp. com o plasmídeo pPGW-HpH-RFP

Penicillium sp. foi cultivado sobre disco de papel celofane colocado em meio BDA a 28 °C por 14 h. O micélio foi coletado com uma espátula e utilizado para preparação de protoplastos. Os protoplastos foram obtidos conforme método proposto por Dias et al. (1999) com modificações. Um volume de 5 ml de estabilizador osmótico (tampão fosfato 10 mM, KCl 0,6 M) e 30 mg de Lysing Enzymes L1412 (SIGMA®) foram adicionados a 800 mg de micélio e a mistura foi colocada a 80 rpm e 30 °C por um período de 3- 4 h. Os protoplastos foram filtrados utilizando uma seringa com gaze e centrifugados a 5.000 g por 10 min. A centrifugação em 5 mL de estabilizador osmótico (KCl 0,8 M em tampão fosfato 0,01 M, pH 5,8) foi realizada duas vezes. O *pellet* foi ressuspenso em tampão ST (sorbitol 1 M; Tris-HCl, 0,01 M, pH 7,5) até uma concentração final de 1x10⁷ protoplastos.mL⁻¹. Em 200 µL da suspensão de protoplastos foram adicionados 5 µL do plasmídeo pPGW-HpH-RFP (2,0 µg/µL) e 50 µL da solução de PEG (polietilenoglicol 6000 60 %; Tris-HCl 100 mM pH 7,5; CaCl₂ 50 mM) e a mistura foi incubada a 0 °C

durante 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados mais 500 μL da solução de PEG e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. Os protoplastos foram plaqueados pelo método Pour Plate em BDA com sacarose 0,56 M. As placas foram incubadas a 25 °C. Após 24 h, 10 mL de BDA contendo higromicina (200 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados sobre o meio de cultura, formando uma sobrecamada, nas placas da transformação. As placas foram incubadas novamente a 25 °C até o aparecimento de colônias transformadas, que posteriormente foram purificadas por meio do cultivo monospórico. A avaliação da fluorescência foi feita por observações sob o microscópio de fluorescência EVOS M5000 *Imaging System* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Colonização de *Penicillium* sp. em plantas de feijão-comum

Entre as colônias de *Penicillium* sp. transformadas (denominadas *Penicillium* sp. RFP), foi selecionado um transformante fluorescente para o experimento de colonização. Sementes de feijão-comum cultivar Pérola foram desinfestadas na seguinte ordem: álcool 70 % por 30 segundos; solução de hipoclorito de sódio 0,5 % por 5 min; lavadas por 3 vezes com água destilada. Posteriormente, foram transferidas para placas de Petri contendo papel filtro umedecido. As sementes foram incubadas a 25 °C no escuro por 3 dias para germinação.

Após a germinação das sementes, elas foram transferidas para copos plásticos de 50 mL contendo 1 mL de suspensão de conídios na concentração de 1×10^6 conídios. mL^{-1} de *Penicillium* sp. RFP. Em seguida, os copos foram cobertos com filme plástico de PVC e incubados a 28 °C por 24 h. Após esse período, as sementes foram plantadas em vasos contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças® e avaliadas 14 dias após a inoculação (DAI).

As avaliações foram feitas da seguinte forma: as radículas foram lavadas cuidadosamente em água corrente e foram realizados cortes a mão livre em três regiões da radícula: DZ- zona da divisão celular; EZ- zona de alongamento e MZ- zona de início da maturação. Foram realizadas observações sob o microscópio de fluorescência EVOS M5000 *Imaging System* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Avaliação da promoção de crescimento vegetal *in vivo*

Sementes de feijão-comum cultivar Pérola foram desinfestadas na seguinte ordem: álcool 70 % por 5 minutos; solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % por 5 minutos e lavadas 3 vezes com água destilada. As sementes foram mantidas em suspensão de conídios na concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ de *Penicillium* sp. e como controle as sementes foram mantidas em água destilada estéril por 24h. Posteriormente, as sementes microbiolizadas foram transferidas para vasos de 2L contendo solo:areia (6:4) e avaliadas no final do estágio vegetativo. Foram analisados: o número de folhas, altura da parte aérea, comprimento da raiz, massa seca da parte aérea e a massa seca da raiz. A altura da parte aérea e o comprimento da raiz foram medidos com o auxílio de uma régua e, posteriormente, a parte aérea e a raiz foram cortadas em porções menores e colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 60 °C para secagem. A massa seca foi mensurada em uma balança de precisão (Aaker Bel Engineering- min 0,01g, máx 500g) quando se atingiu massa constante. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento e três repetições experimentais (Khan et al., 2011).

As análises de macro e micronutrientes foram feitas pelo Laboratório de Análise de Solo, Tecido Vegetal e Fertilizantes do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

O preparo das amostras de tecidos de plantas consistiu da secagem em estufas de circulação forçada durante 72h a uma temperatura entre 68 e 72 °C. Em seguida, as amostras foram pesadas em balança de precisão e moídas em moinhos de facas de aço inox. As amostras após moagem foram acondicionadas em frascos de vidro.

A digestão nítricoperclórica foi feita para determinação dos teores de P, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe, Mn. Em tubos de digestão foram colocados 0,5 g do material moído e posteriormente adicionado 10 mL da mistura de ácido nítrico e ácido perclórico (4:1). Os tubos foram levados em chapa quente pré-aquecida a 80 °C e a temperatura foi elevada gradativamente até atingir 200 °C. Quando o extrato ficou cristalino, foi retirado da chapa para esfriar e posteriormente o volume foi completado para 25 mL com água deionizada. Os minerais foram quantificados utilizando espectrômetro de emissão ótica com plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES; Perkin Elmer Modelo Optima 8300 DV) (Sarruge e Haag, 1974).

A digestão sulfúrica foi feita para determinação do teor de N. Em tubos de digestão foram colocados 0,2 g do material moído e posteriormente adicionado 5 mL da mistura de ácido sulfúrico. Os tubos foram levados em chapa quente pré-aquecida a 120 °C e temperatura foi elevada gradativamente até atingir 350 °C. Quando o extrato ficou cristalino, foi retirado da chapa para esfriar e posteriormente completou o volume para 50 mL com água deionizada. Para determinar a concentração de nitrogênio, o tubo do bloco digestor com extrato foi levado ao destilador Kjeldahl e foram adicionados 25 mL de NaOH e foi iniciada a destilação. Na reação do NH_4 com a base, há liberação de NH_3 que é arrastado pelo vapor d'água para um erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de indicador de ácido bórico, que fornece um H^+ para recompor o NH_4^+ , que foi dosado com uma solução de HCl 1N, usando uma microbureta (Sarruge e Haag, 1974).

Análise estatística

Os experimentos foram realizados por, pelo menos, três vezes e os resultados foram apresentados em termos de média e erro padrão dos valores obtidos em três ou mais repetições. Todos os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software GraphPad Prism V.8.0.1 (Mavrevski et al., 2018).

Resultados

Tolerância a cloreto de sódio e diferentes valores de pH

Penicillium sp. apresentou capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl (Figura 1A). O diâmetro da colônia nas concentrações de 0- 2% de NaCl não apresentou diferença estatística (Figura 1B). Além disso, observou-se que *Penicillium* sp. apresentou tolerância até 10% de NaCl e não manifestou resistência a níveis mais elevados de NaCl.

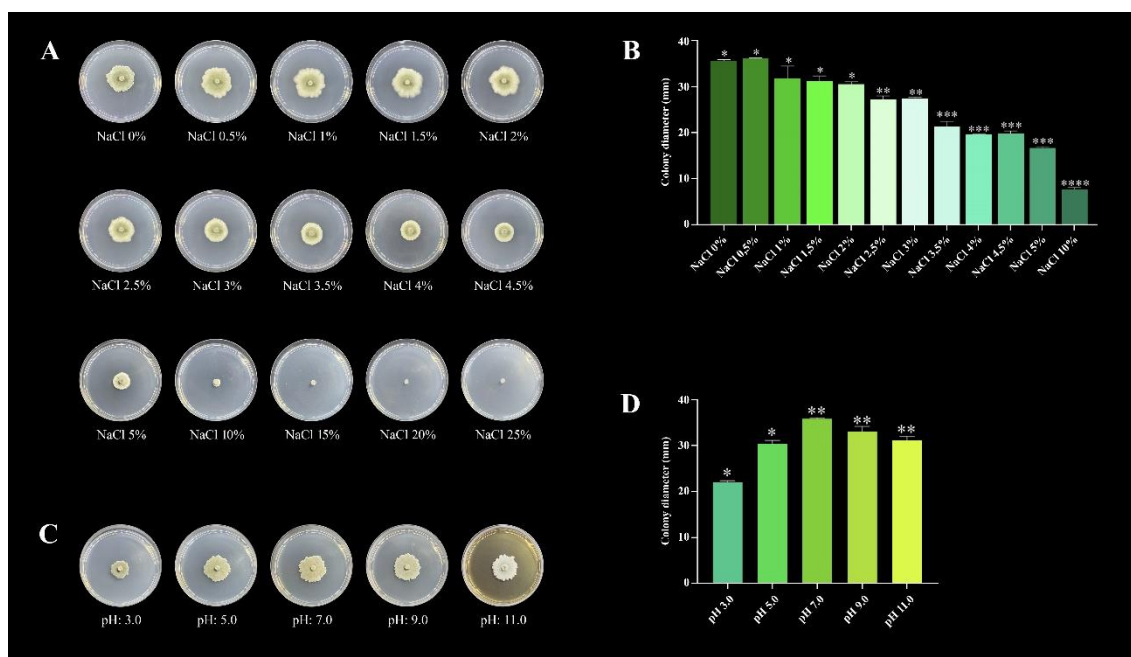


Figura 1: (A) Crescimento da colônia de *Penicillium* sp. em meio BDA com diferentes concentrações de NaCl após 7 dias de incubação a 28 °C. (B) Diâmetro da colônia (mm) de *Penicillium* sp. em meio BDA com diferentes concentrações de NaCl após 7 dias de incubação a 28 °C. As barras de erro representam o desvio padrão dos dados e os asteriscos representam a diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (0 % de NaCl). (C) Crescimento da colônia de *Penicillium* sp. em meio BDA com diferentes pH. (D) Diâmetro da colônia (mm) de *Penicillium* sp. em meio BDA com diferentes pH após 7 dias de incubação a 28 °C. As barras de erro representam o desvio padrão dos dados e os asteriscos representam a diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (pH=7,0).

Em relação à tolerância a diferentes valores de pH, *Penicillium* sp. apresentou capacidade de crescimento em todos os valores estabelecidos (Figura 1C). Nas condições de pH 7,0 foi onde ocorreu a melhor adaptabilidade do fungo. No entanto, nas condições de pH 9,0 e 11,0 não houve diferença estatística no crescimento em relação ao pH 7,0 (Figura 1D).

Avaliação *in vitro* do potencial antagonístico de *Penicillium* sp.

Avaliação da atividade antagonística por meio de compostos difusíveis no meio de cultura

A atividade antagonista de *Penicillium* sp. frente a oito fitopatógenos foi avaliada pelo método de cultura pareada em que compostos difusíveis são liberados no meio de cultura. Os resultados revelaram que *Penicillium* sp. produz compostos com capacidade de inibir o crescimento dos fitopatógenos *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* e

Corynespora sp. No confronto com *S. sclerotiorum*, *Penicillium* sp. provocou 54,55% de inibição. Em relação a *C. lindemuthianum* e *Corynespora* sp., *Penicillium* sp. induziu um índice de inibição de 50,02 % e 49,77 %, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Diâmetro da colônia fúngica de diferentes fitopatógenos e índice de inibição (IC) na presença de compostos difusíveis produzidos por *Penicillium* sp. no meio de cultura.

Fitopatógeno	Diâmetro da colônia (mm) ⁽¹⁾		IC (%) ⁽²⁾
	Controle (mm)	Tratamento (mm)	
<i>C. gloeosporioides</i>	85,65 ^a	64,39±0,6513 ^b	24,82
<i>C. boninense</i>	86,48 ^a	67,20±0,4344 ^b	22,29
<i>C. acutatum</i>	83,96 ^a	65,93±0,2200 ^b	21,47
<i>C. lindemuthianum</i>	36,04 ^a	18,01±0,4393 ^b	50,02
<i>C. falcatum</i>	87,45 ^a	62,06±1,174 ^b	29,03
<i>C. graminicola</i>	68,94 ^a	54,95±1,202 ^b	20,29
<i>Corynespora</i> sp.	86,69 ^a	43,54±1,067 ^b	49,77
<i>S. sclerotiorum</i>	89,15 ^a	40,54±0,6867 ^b	54,55

(1) Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 3). (2) Em relação ao controle.

As áreas de inibição do crescimento fúngico causada pela presença do *Penicillium* sp. foram formadas na superfície do meio de cultura (Figura 2). Esses resultados evidenciam a eficácia *Penicillium* sp. na supressão do crescimento de fungos fitopatogênicos do feijão-comum (*S. sclerotiorum* e *C. lindemuthianum*).

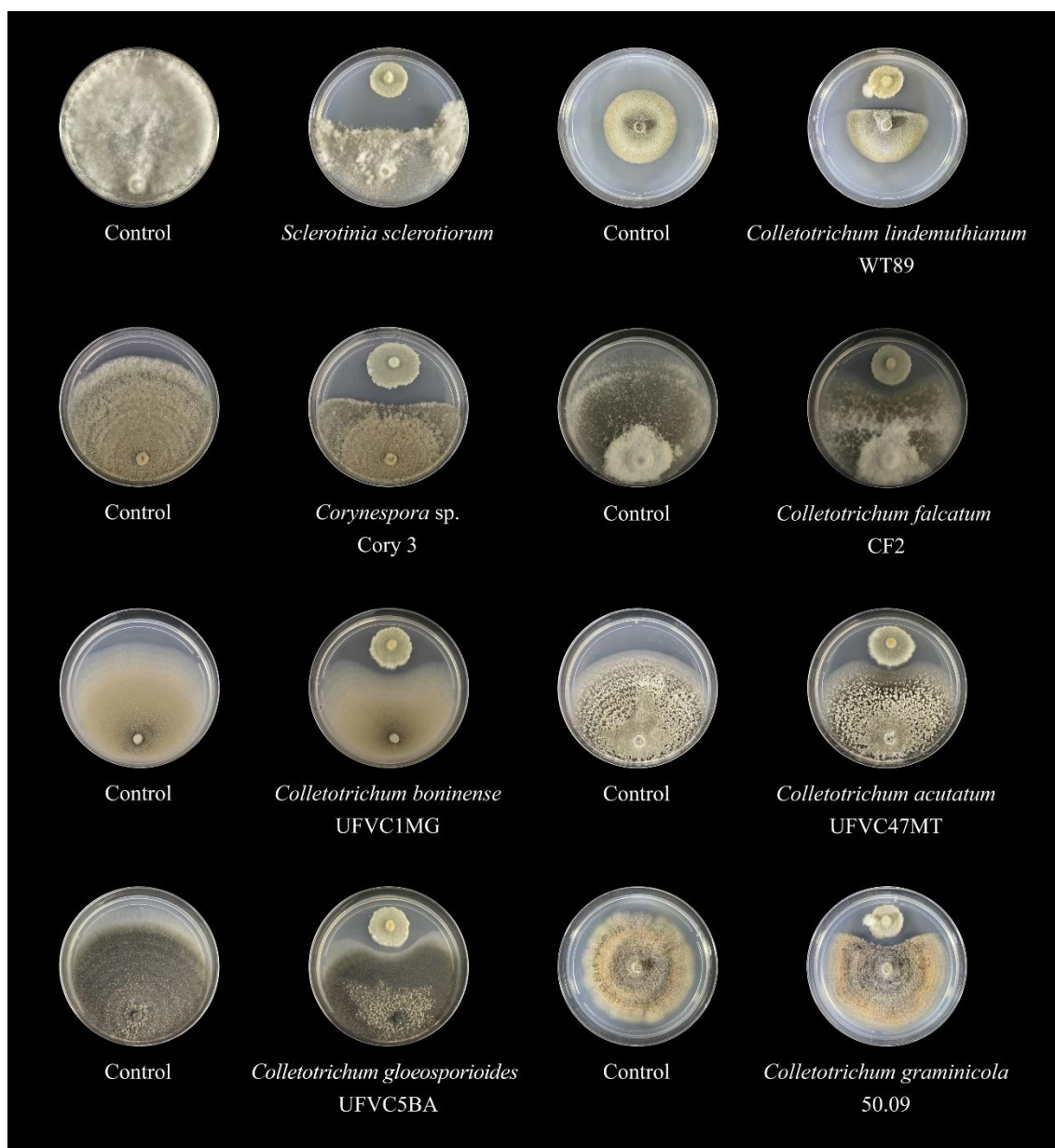


Figura 2: Avaliação da atividade antagonista de *Penicillium* sp. a oito diferentes fitopatógenos por cultura dupla. *Sclerotinia sclerotiorum* foi cultivado em meio BDA durante 7 dias a 25 °C e *C. lindemuthianum* foi cultivado em meio YMC por 7 dias a 22°C com fotoperíodo de 12 h. *Colletotrichum graminicola*, *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. gloeosporioides* e *C. falcatum* foram cultivados em meio BDA a 22°C com fotoperíodo de 12 h e *Corynespora* sp. foi cultivado em meio BDA a 28°C durante 7 dias.

Avaliação da inibição da germinação de conídios dos fitopatógenos por metabólitos produzidos por *Penicillium* sp.

Penicillium sp. gerou metabólitos secundários que inibiram a germinação dos conídios dos fitopatógenos testados. Após 48 h de incubação, o índice de inibição foi de

93,3 % para *C. gloeosporioides*, 94,1 % para *C. boninense*, 98,7 % para *Corynespora* sp., 99,3 % *C. graminicola* e 100 % para *C. lindemuthianum* (Figura 3).

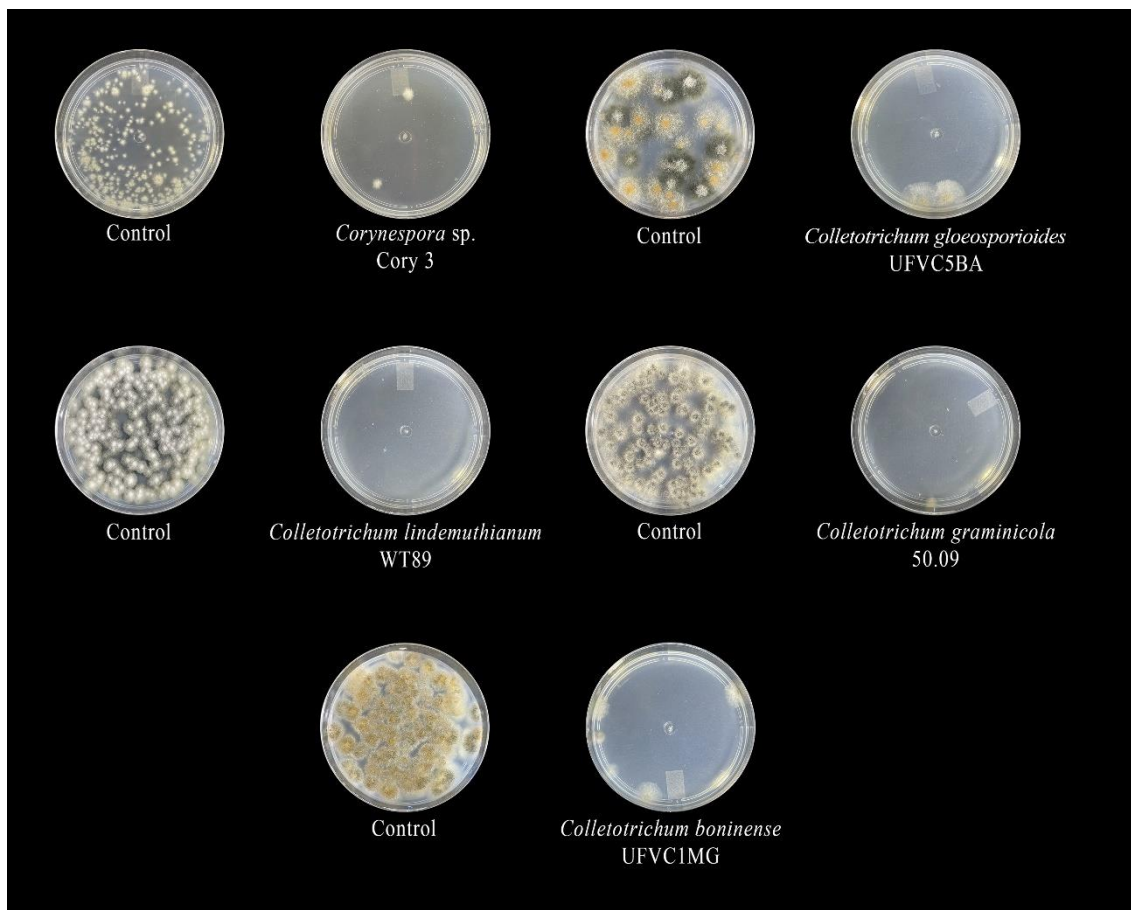


Figura 3: Avaliação da capacidade de *Penicillium* sp. em inibir a germinação de conídios dos fitopatógenos. A figura mostra a comparação entre a taxa de germinação de conídios dos fitopatógenos na ausência de metabólitos (**Control**) e na presença de metabólitos produzidos por *Penicillium* sp. É possível observar redução significativa na germinação de conídios dos fitopatógenos na presença dos metabólitos produzidos por *Penicillium* sp., indicando seu potencial como agente de biocontrole.

Avaliação da atividade antagônica por meio da produção de compostos orgânicos voláteis

Na avaliação da atividade antagônica por meio da produção de compostos orgânicos voláteis, *Penicillium* sp. foi capaz de inibir o crescimento de alguns fitopatógenos. No confronto com *S. sclerotiorum*, o endófito demonstrou a mais alta porcentagem de inibição, atingindo 80%. Também se destacou a inibição dos fitopatógenos *C. lindemuthianum* e *Corynespora* sp., apresentando significativas porcentagens de inibição de 55,5% e 57,3%, respectivamente. Para os fitopatógenos *C.*

boninense, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, foram observadas porcentagens de inibição mais moderadas, mas ainda consideráveis, de 43,8 %, 42,8 % e 42,7 %, respectivamente. Quanto à inibição do crescimento do *C. graminicola*, foi encontrada uma porcentagem menor, contribuindo significativamente com 28 % de inibição. No entanto, para o fitopatógeno *C. falcatum* não houve inibição do crescimento (Figura 4).

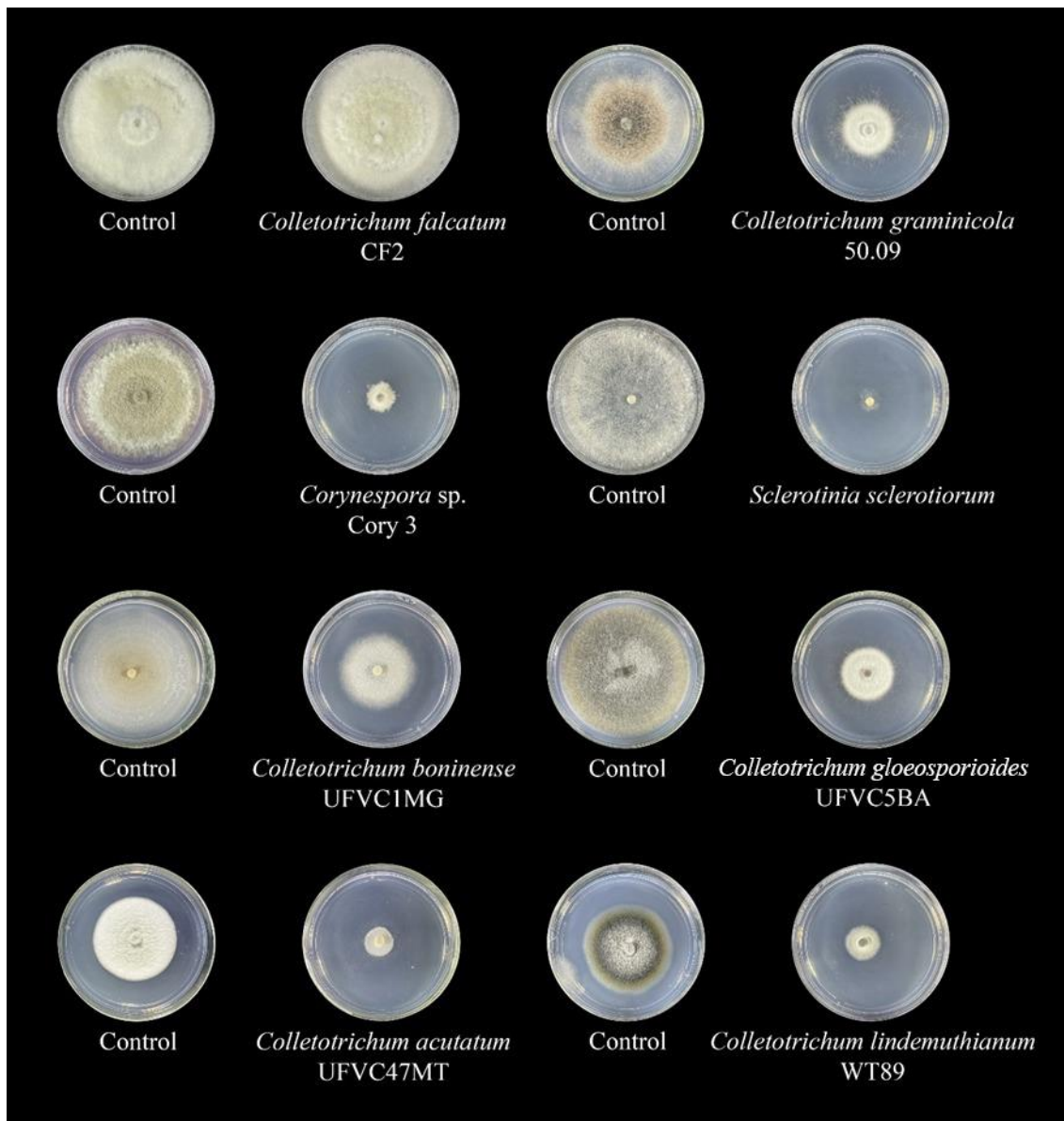


Figura 4: Avaliação da atividade antagonista de *Penicillium* sp. por meio da produção de compostos orgânicos voláteis em ensaio realizado em placas duplas vedadas. A figura mostra o efeito dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Penicillium* sp. sobre o crescimento dos fitopatógenos. **(Control)** Placa controle sem *Penicillium* sp. Observa-se uma inibição significativa do crescimento dos fitopatógenos na presença dos compostos orgânicos voláteis emitidos pelo *Penicillium* sp., demonstrando seu potencial antagonista.

Avaliação *in vivo* do potencial antagonístico de *Penicillium sp.*

Avaliação do controle da antracnose

O resultado da avaliação do antagonismo de *C. lindemuthianum* em plantas de feijão-comum revelou que houve redução na área de lesão quando as plantas foram tratadas com *Penicillium sp.* via aplicação foliar. As plantas de feijão-comum tratadas com *Penicillium sp.* apresentaram área lesionada de 0,49 %, enquanto as plantas de feijão-comum do controle positivo apresentaram área lesionada de 6,14 %, ou seja, houve uma redução significativa de 91,9 %. Esse resultado mostra que a aplicação de *Penicillium sp.* contribuiu significativamente para a redução da antracnose no feijão-comum (Figura 5).

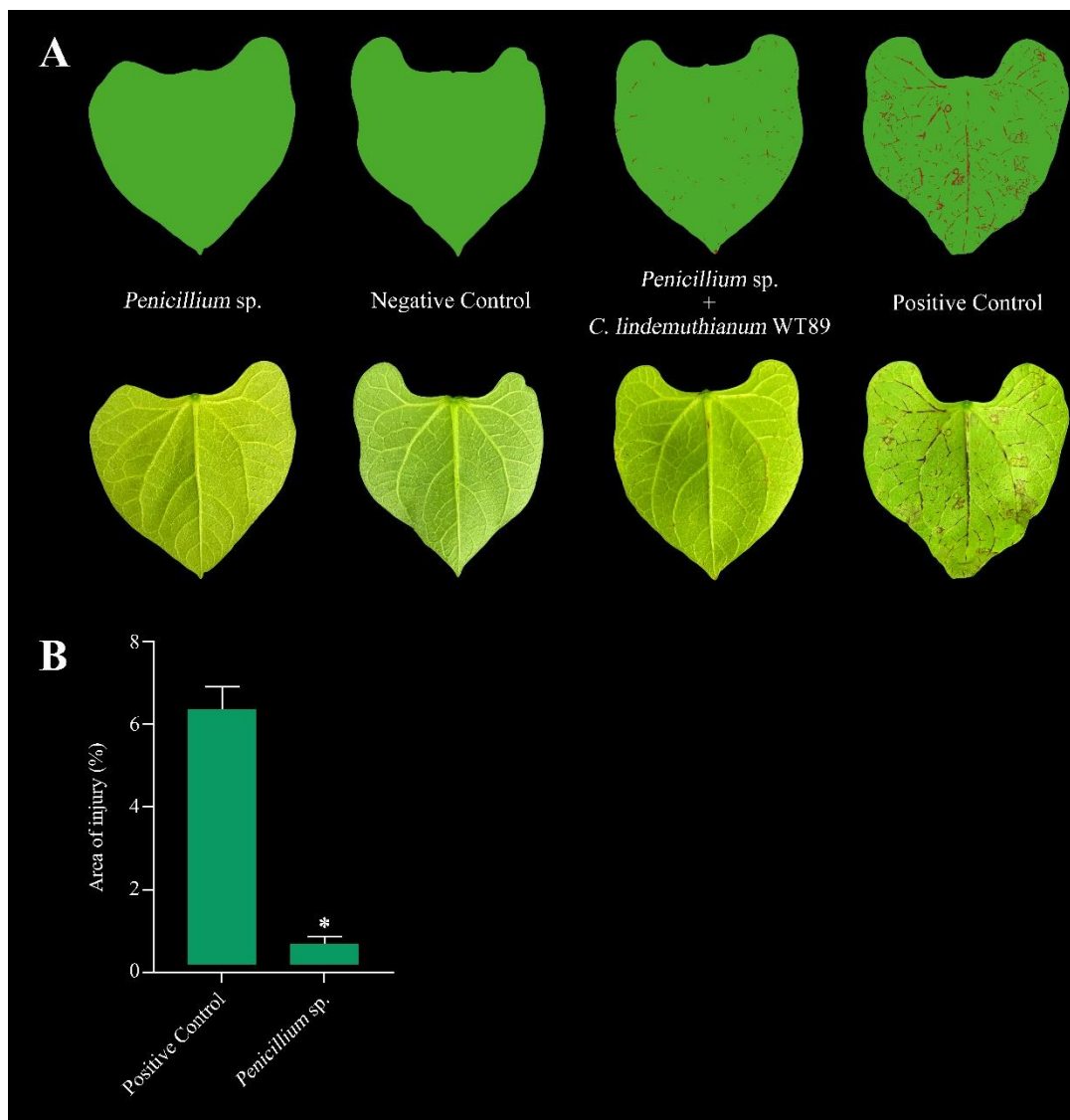


Figura 5: Avaliação do controle da antracnose em feijão-comum por *Penicillium sp.* (A) Representação computacional do software Quant das lesões causadas por *C. lindemuthianum* nas folhas de feijão-comum

e folhas reais das plantas de feijão-comum mostrando a área de lesão causada pelo fitopatógeno *C. lindemuthianum* WT 89. (B) Gráfico mostrando a redução da área de lesão das folhas das plantas de feijão-comum tratadas com *Penicillium* sp. e o fitopatógeno *C. lindemuthianum* em relação ao tratamento controle positivo (inoculação apenas do fitopatógeno *C. lindemuthianum*). As barras de erro representam o desvio padrão dos dados e os asteriscos representam a diferença estatística dos tratamentos.

Avaliação do controle do mofo-branco

A severidade da doença mofo-branco em plantas de feijão-comum foi avaliada por meio de escala de notas, e os sintomas foram observados durante sete dias após a inoculação do fitopatógeno *S. sclerotiorum*, com base na qual foi calculado o Índice de Doença (ID) e a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Após esse período de sete dias, o controle positivo apresentou um ID de 99,38 % e o controle negativo apresentou uma ID de 0 %, confirmando a presença e ausência da doença, respectivamente. O tratamento apenas com *Penicillium* sp. apresentou ID de 0 % e o tratamento com *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum* exibiu um ID de 66,66 % (Figura 6A).



Figura 6: Avaliação do controle do mofo-branco por *Penicillium* sp. (A) Imagens das plantas após 7 dias de inoculação da *S. sclerotiorum*. Positive control: planta tratada com *S. sclerotiorum*. Negative

control: planta tratada com um disco de ágar. Tratamento 1: planta tratada com *Penicillium* sp. e com *S. sclerotiorum*; Tratamento 2: planta tratada com *Penicillium* sp. **(B)** Gráfico do índice da doença e progresso da doença durante o período de avaliação, mostrando o progresso da doença ao longo do tempo. **Tratamento *S. sclerotiorum*:** planta tratada com *S. sclerotiorum* e **tratamento *S. sclerotiorum* x *Penicillium* sp.:** planta tratada com *Penicillium* sp. e posteriormente com *S. sclerotiorum*.

A AACPD no feijão-comum foi rastreada, e comparando as plantas tratadas com *Penicillium* sp. com as plantas do controle positivo, houve redução na progressão da doença, implicando que o fungo endofítico consegue retardar a progressão da doença (Figura 6B).

Avaliação da promoção de crescimento vegetal *in vitro*

Para a avaliação da promoção de crescimento vegetal, métodos qualitativos foram usados para investigar diferentes aspectos do potencial de *Penicillium* sp. Os resultados dos ensaios foram positivos para a solubilização de fosfato, produção de amônia, capacidade de sintetizar o ácido indol acético (AIA) e giberelina, e para a produção de sideróforos. Além disso, a avaliação qualitativa da produção de enzimas também revelou halos de degradação, evidenciando a atividade específica das enzimas amilase, CMCase, lipase, pectinase e protease pelo fungo *Penicillium* sp. (Figura Suplementar S1).

Colonização de *Penicillium* sp. em plantas de feijão-comum

A colonização das radículas de plantas de feijão-comum por *Penicillium* sp. RFP foi observada nos cortes histológicos. Em um segmento da raiz de planta com 14 DAI, na zona de início da maturação (MZ) foi encontrada maior incidência de fluorescência, mostrando que foi colonizado por *Penicillium* sp. RFP, que formou aglomerados na superfície das células externas da epiderme da raiz (Figura 7). Além disso, também foi possível ver pequenos aglomerados um pouco mais internos (Figura 7G). A microscopia de fluorescência dos cortes histológicos da raiz do feijão-comum revelou que *Penicillium* sp. RFP foi capaz de colonizar as células da superfície da raiz do feijão.

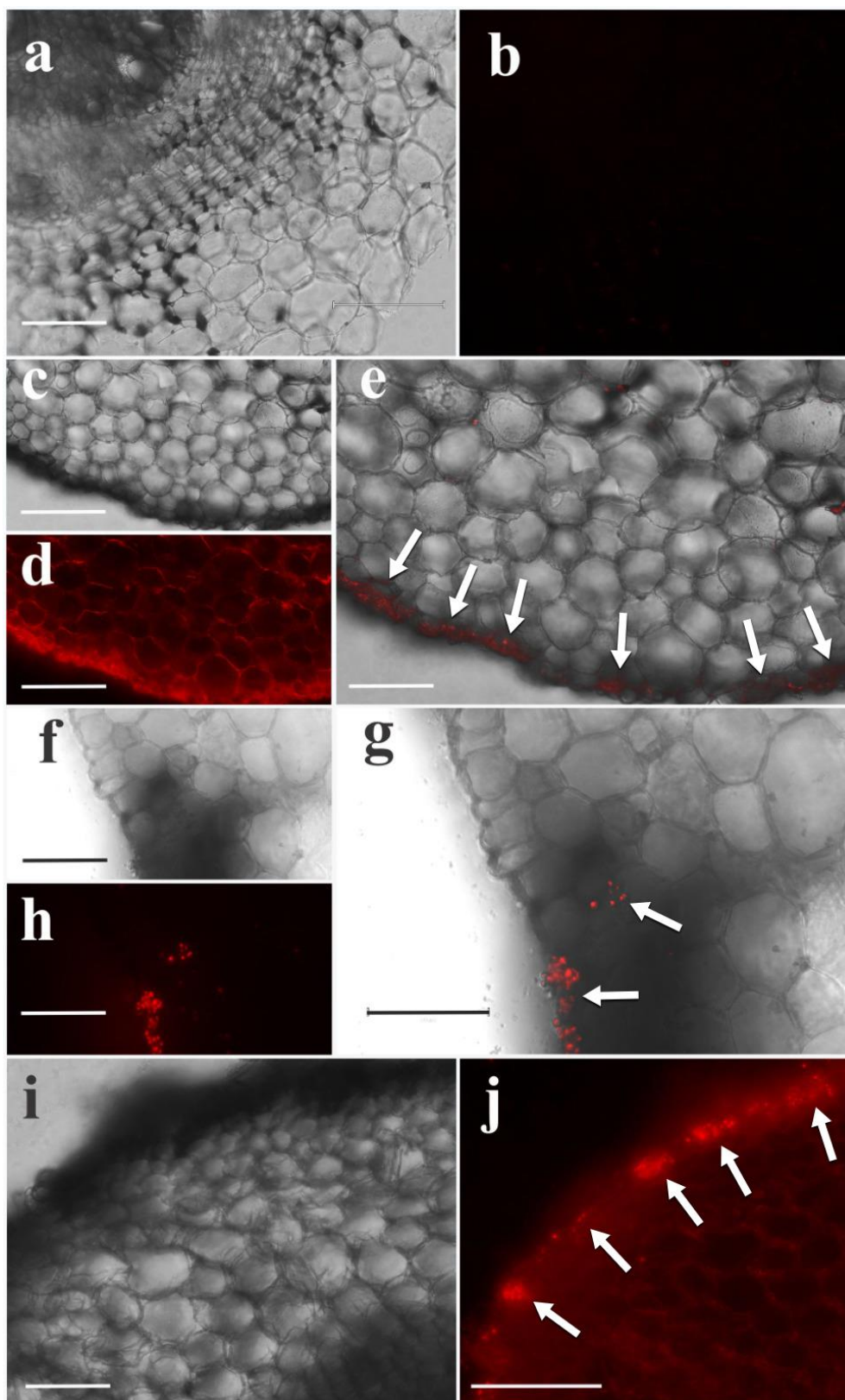


Figura 7: Cortes histológicos da raiz de feijão-comum colonizado por *Penicillium* sp. RFP. (A e B) Controle - Cortes histológicos da estrutura da raiz na região MZ sem a inoculação de *Penicillium* sp.RFP. **(C, F, e I)** Imagens tiradas sem filtro RFP dos cortes histológicos da estrutura da raiz na região MZ após a inoculação de *Penicillium* sp. RFP. **(D, H e J)** Imagens tiradas com filtro RFP dos cortes histológicos da

estrutura da raiz na região MZ após a inoculação de *Penicillium* sp. RFP. (E e G) Imagens com a sobreposição das imagens tiradas com e sem filtro RFP os cortes histológicos da estrutura da raiz na região MZ após a inoculação de *Penicillium* sp. RFP. As setas destacam os aglomerados de células de *Penicillium* sp. RFP na superfície da raiz do feijão-comum.

Avaliação da promoção de crescimento vegetal *in vivo*

Penicillium sp. foi capaz de promover o crescimento do feijão-comum, confirmando o potencial detectado nos ensaios *in vitro*. Ao analisar as plantas inoculadas com o endófito, observou-se maior crescimento quando comparado com as plantas controle (Figura 8A e B). Além disso, a altura da parte aérea foi estatisticamente diferente do controle, com aumento de 33,9 % nos tratamentos onde as plantas foram inoculadas com *Penicillium* sp. Em relação ao comprimento da raiz, plantas inoculadas com *Penicillium* sp. apresentaram um aumento de 11,7 % em relação as plantas controle, não inoculadas (Figura 8B e C).

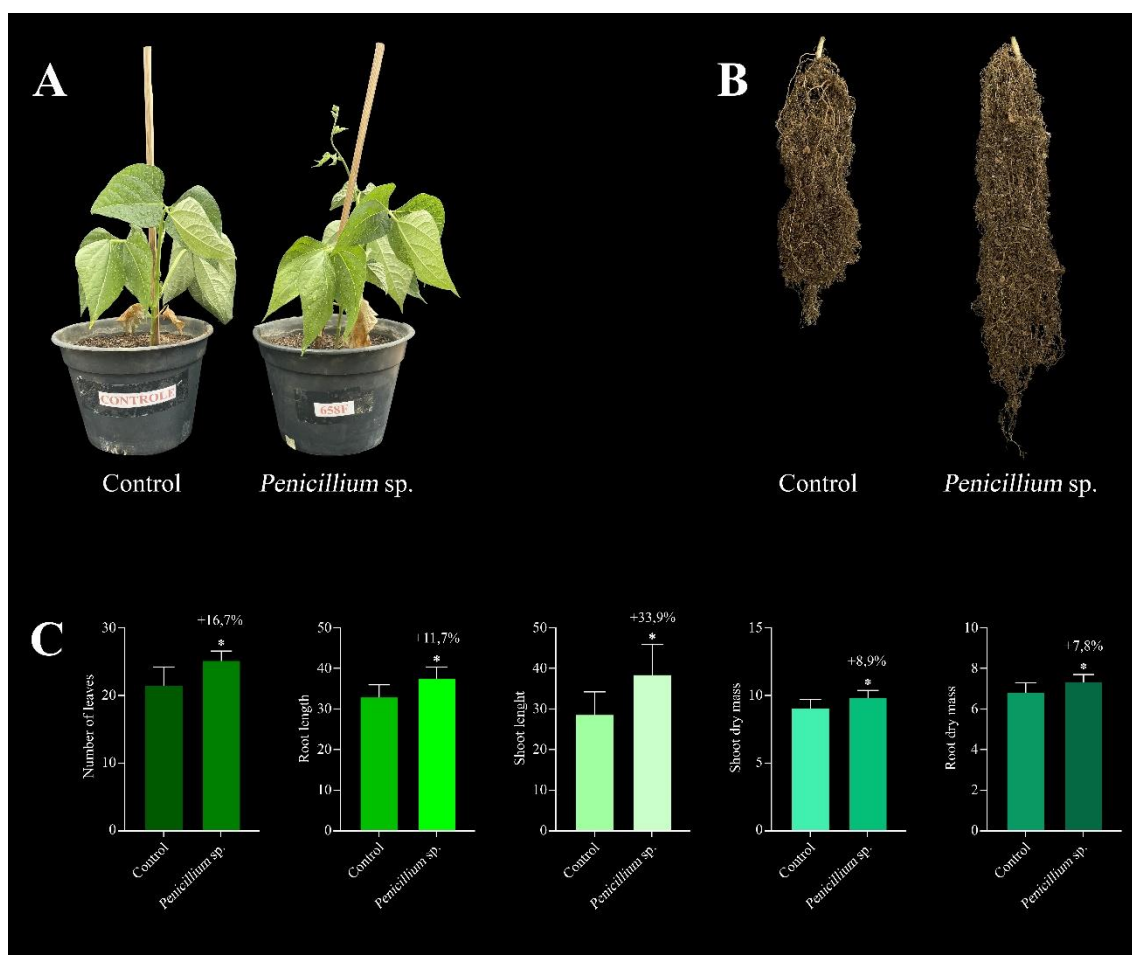


Figura 8: Avaliação da promoção de crescimento do feijão-comum por *Penicillium* sp. (A) Desenvolvimento das plantas controle e das plantas inoculadas com *Penicillium* sp. (B) Comprimento das

raízes das plantas controle (sem inoculação do fungo endofítico e das plantas inoculadas com *Penicillium* sp. (C) Gráficos com análises estatística, em que as barras de erro representam o desvio padrão dos dados e os asteriscos representam a diferença estatística dos tratamentos.

Ao avaliar a massa seca da parte aérea e da raiz, foi observado que plantas inoculadas com *Penicillium* sp. apresentaram diferenças significativas em relação ao controle de 8,9 % e 7,8 %, respectivamente (Figura 8C).

As análises de macro e micronutrientes das plantas de feijão-comum permitiram detectar que plantas tratadas com *Penicillium* sp. tiveram um aumento no conteúdo da raiz de N, no conteúdo da parte aérea de N, P, Ca e Mg e no conteúdo total de N, P, Ca, Mg, Cu e Zn (Tabela 2, 3 e 4), e tiveram também um aumento na eficiência de utilização de N, P, Ca e Mg e na eficiência de translocação de N e P (Figura 9B e 9C).

Tabela 2: Conteúdo de macro e micronutrientes das raízes das plantas de feijão-comum inoculadas com *Penicillium* sp.

Conteúdo da raiz (mg)		
Macro e micronutrientes	Controle ⁽²⁾	<i>Penicillium</i> sp. ⁽¹⁾
N	155,8 ^a	180,5±0,8025 ^b
P	27,60 ^a	29,92±0,2584 ^a
K	110,7 ^a	104,2±0,057 ^a
Ca	120,4 ^a	124,5±0,6411 ^a
Mg	17,41 ^a	20,59±0,5257 ^a
Cu	1065 ^a	1380±0,5596 ^a
Fe	542,2 ^a	521,5±0,007 ^a
Zn	7,497 ^a	9,200±0,3154 ^a
Mn	8,640 ^a	10,97±0,4389 ^a

⁽¹⁾ Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 3). ⁽²⁾ Em relação ao controle.

Tabela 3: Conteúdo de macro e micronutrientes da parte aérea das plantas de feijão-comum inoculadas com *Penicillium* sp.

Conteúdo da parte aérea (mg)		
Macro e micronutrientes	Controle ⁽²⁾	<i>Penicillium</i> sp. ⁽¹⁾
N	310,5 ^a	379,7±0,7815 ^b
P	30,22 ^a	38,68±0,7149 ^b

K	257,0 ^a	342,9±0,4321 ^a
Ca	210,2 ^a	238,7±0,6949 ^b
Mg	57,29 ^a	69,31±0,8074 ^b
Cu	0,2744 ^a	0,3421±0,4889 ^a
Fe	12,83 ^a	10,85±0,056 ^a
Zn	3,847 ^a	4,979±0,5676 ^a
Mn	3,400 ^a	3,911±0,4904 ^a

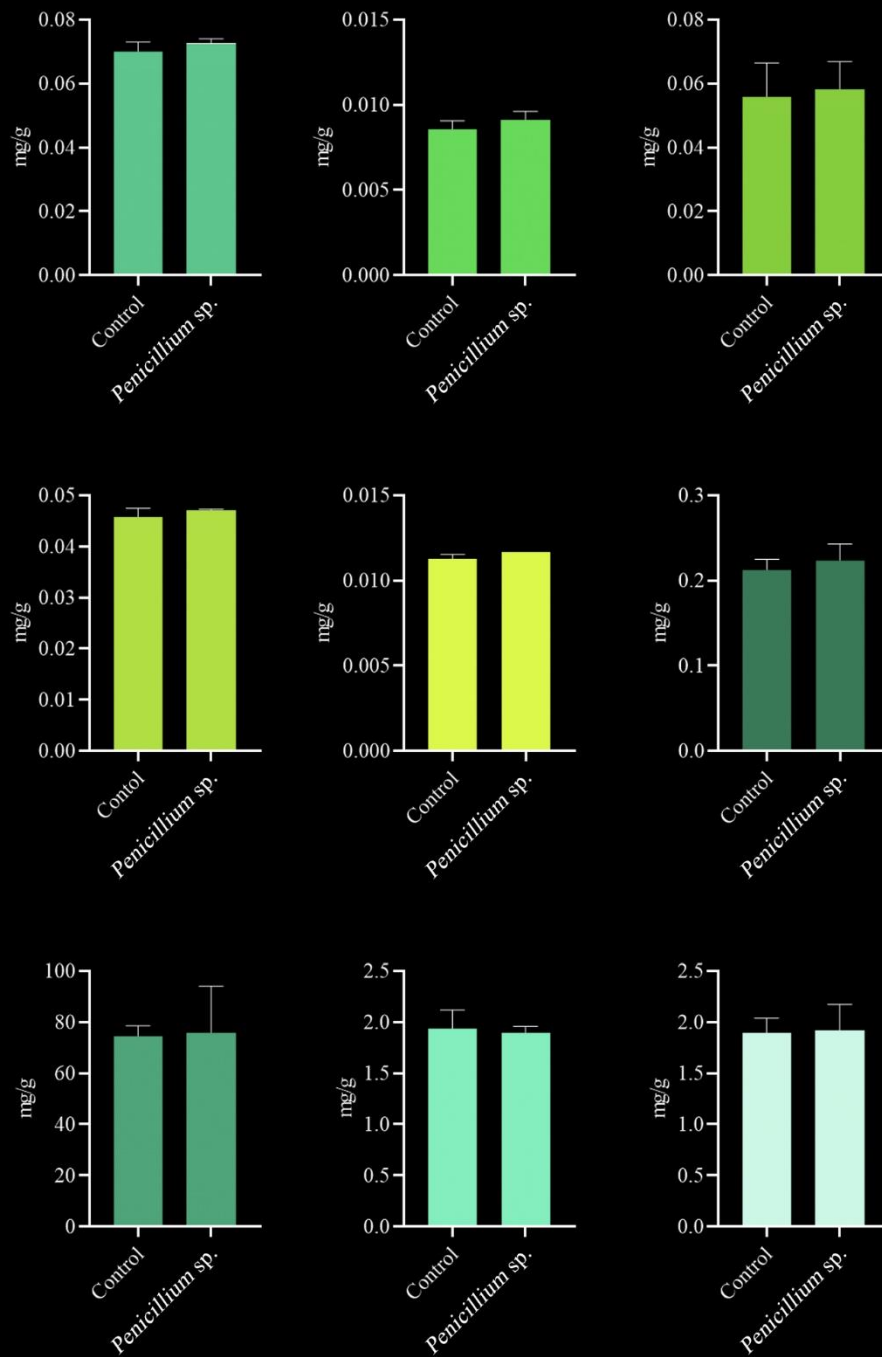
⁽¹⁾ Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 3). ⁽²⁾ Em relação ao controle.

Tabela 4: Conteúdo total de macro e micronutrientes das plantas de feijão-comum inoculadas com *Penicillium* sp.

Conteúdo da parte aérea (mg)		
Macro e micronutrientes	Controle ⁽²⁾	<i>Penicillium</i> sp. ⁽¹⁾
N	466,2 ^a	560,3±0,9249 ^b
P	57,82 ^a	68,60±0,9506 ^b
K	367,7 ^a	447,2±0,3906 ^a
Ca	303,6 ^a	363,2±0,9333 ^b
Mg	74,7 ^a	89,91±0,9256 ^b
Cu	1,340 ^a	1,723±0,6879 ^b
Fe	468,5 ^a	571,3±0,253 ^a
Zn	11,43 ^a	14,45±0,8093 ^b
Mn	12,04 ^a	14,88±0,5174 ^a

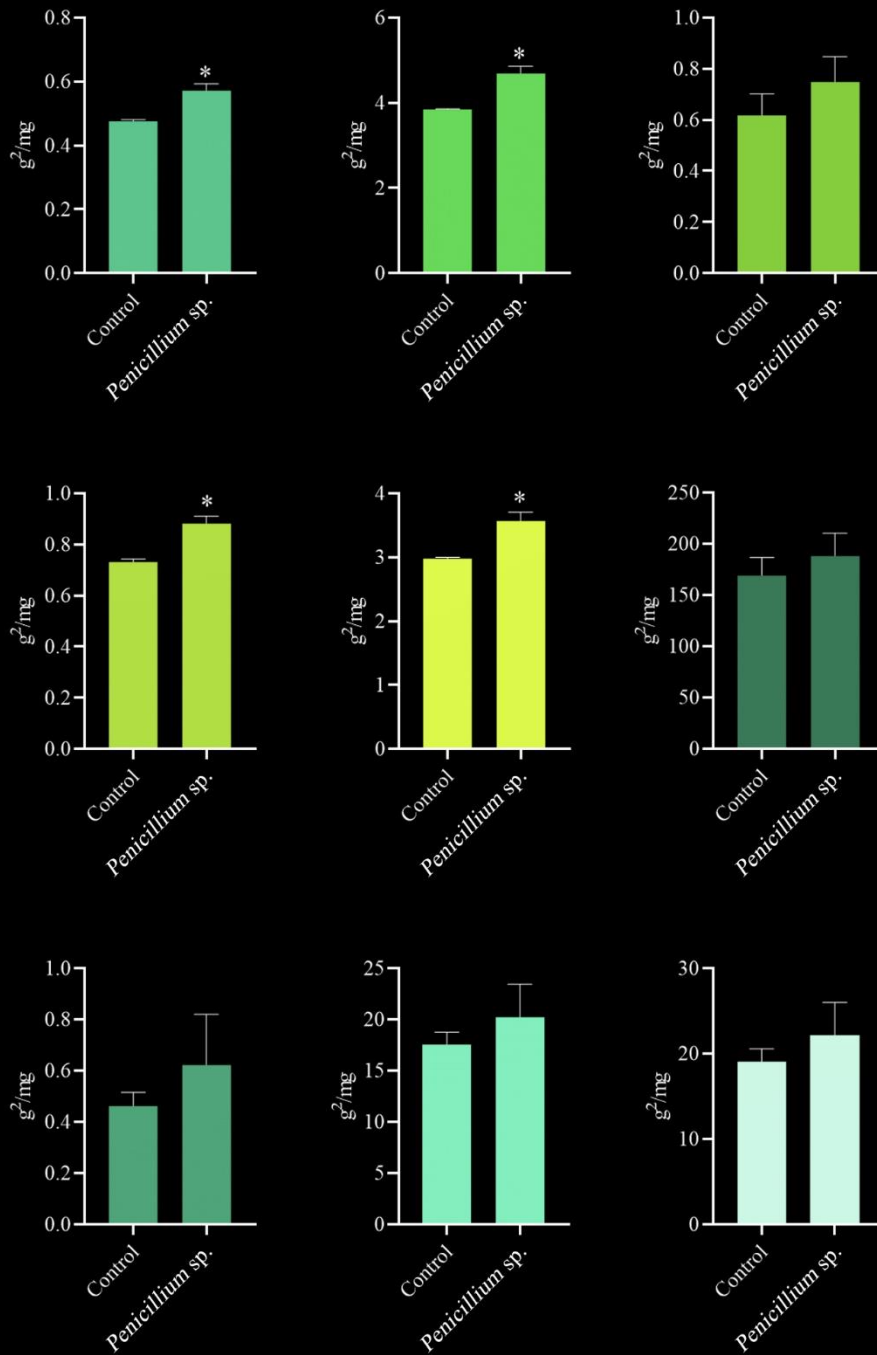
⁽¹⁾ Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 3). ⁽²⁾ Em relação ao contro

A. Acquisition Efficiency



■ N
 ■ P
 ■ K
 ■ Ca
 ■ Mg
 ■ Cu
 ■ Fe
 ■ Zn
 ■ Mn

B. Use efficiency



■ N
 ■ P
 ■ K
 ■ Ca
 ■ Mg
 ■ Cu
 ■ Fe
 ■ Zn
 ■ Mn

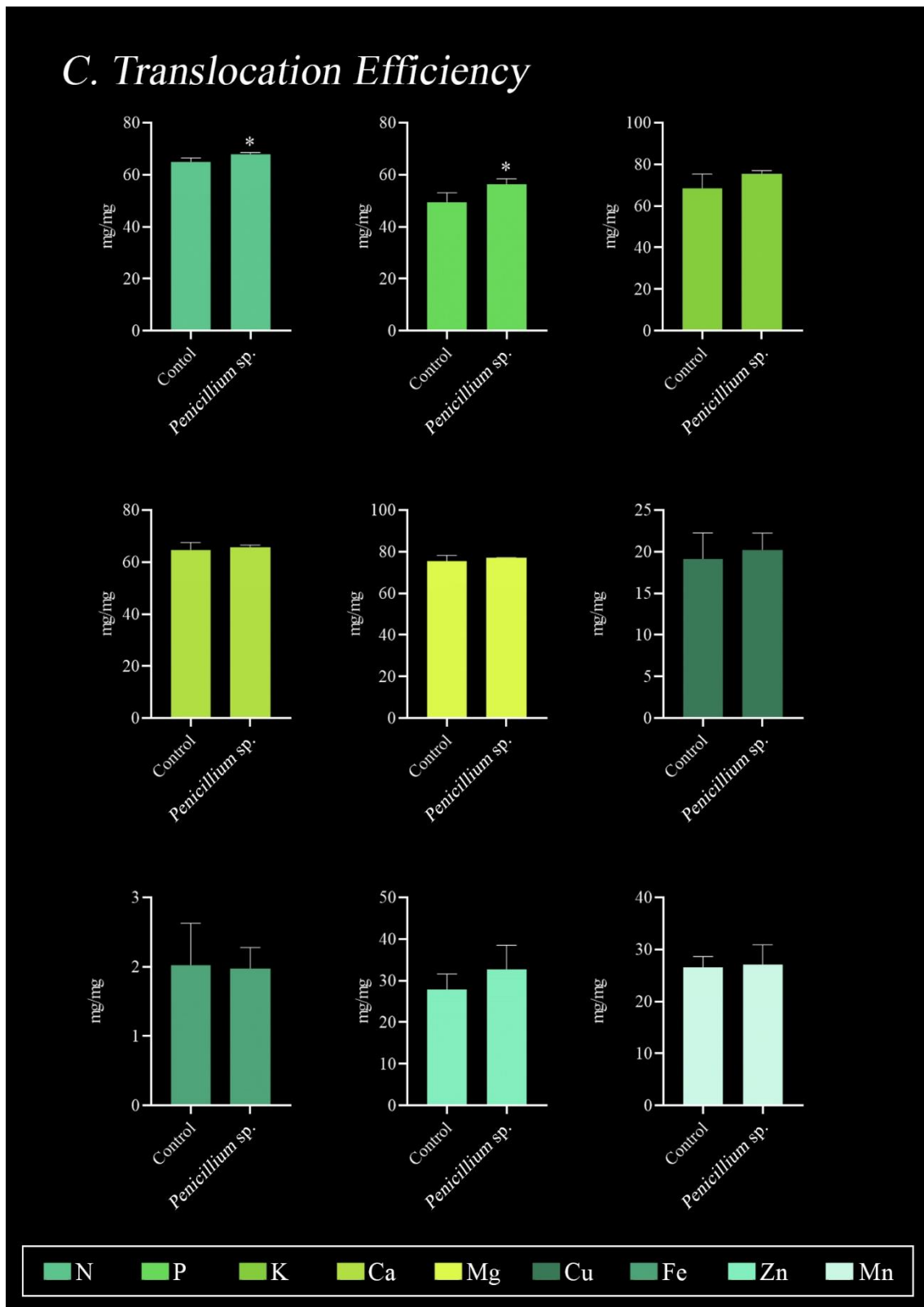


Figura 9: (A) Gráficos com médias de eficiência de aquisição de macro e micronutrientes das plantas de feijão-comum sem e com a inoculação de *Penicillium* sp. (B) Gráficos com as médias de eficiência de utilização de macro e micronutrientes das plantas de feijão-comum sem e com a inoculação de *Penicillium*

sp. (C) Gráficos com médias de eficiência de translocação de macro e micronutrientes das plantas de feijão-comum sem e com a inoculação de *Penicillium* sp. As barras de erro representam o desvio padrão dos dados e os asteriscos representam a diferença estatística dos tratamentos.

Discussão

A agricultura enfrenta desafios significativos, como por exemplo a escassez de água, salinização do solo, o uso elevado de insumos químicos, a ocorrência de surtos de pragas e doenças, além de questões ambientais. Para minimizar o impacto ambiental da agricultura, é necessário adotar técnicas de produção mais sustentáveis, utilizando insumos renováveis e não limitados. Nesse contexto, a utilização de microrganismos benéficos na produção agrícola é alternativa inteligente, ecológica e econômica para melhorar a produção agrícola e a saúde das plantas de maneira sustentável.

No que diz respeito às condições de cultivo, a caracterização fisiológica é muito importante para obter informações do metabolismo, da adaptabilidade e das possíveis aplicações dos microrganismos em diferentes contextos. O uso de microrganismos que sejam tolerantes ao sal pode ser uma estratégia mais apropriada para minimizar os efeitos deletérios do estresse salino, sendo assim, nesse estudo, foi analisado o efeito do sal no crescimento de *Penicillium* sp. em diferentes concentrações de NaCl. Foi observado o crescimento de *Penicillium* sp. até a concentração de 10 % (p/v) e a inibição do crescimento em concentrações mais altas do sal. Portanto o *Penicillium* sp. pode ser considerado halófilo moderado, pois apresentou crescimento em BDA com NaCl 10 % (p/v). Espécies de *Penicillium* possuem a capacidade de tolerar maiores concentrações de sal devido a alterações na fluidez da membrana plasmática, com regulação da homeostase iônica intracelular, além de sintetizar glicerol intracelular e colina, que atuam como osmoprotetores (Coleine et al., 2022; López et al., 2020; Park et al., 1998). Existem na literatura alguns exemplos que mostram a capacidade de espécies de *Penicillium* de tolerar condições salinas, entre eles, são citados dois exemplos de fungos endofíticos: *P. roqueforti* Thom., que apresentou resposta de tolerância a NaCl até a concentração máxima de 600 mM [3,5 % (p/v)] aumentando a tolerância ao estresse e absorção de nutrientes em plantas de trigo (Ikram et al., 2018) e *P. chrysogenum* P-34, que apresentou resposta de tolerância a NaCl até a concentração de 5%, promovendo o crescimento das plantas e melhorando o desenvolvimento inicial do milho (Galeano et al., 2023). Os resultados obtidos com *Penicillium* sp. ressaltam a adaptabilidade do isolado às diferentes

concentrações de NaCl, porém mostram diferenças pouco significativas às variações de pH.

Os resultados obtidos neste estudo vão ao encontro com os dados da literatura sobre representantes do gênero *Penicillium* e mostram a capacidade do *Penicillium* sp. em produzir metabólitos secundários e compostos orgânicos voláteis com atividade antimicrobiana, podendo vir a ser um novo agente de controle biológico para diferentes fitopatógenos. Fungos do gênero *Penicillium* são considerados fonte rica e diversificada de compostos bioativos, que variam em estrutura e são sintetizados por meio de diferentes vias biossintéticas. Além disso, possuem aplicabilidade em diversas áreas, incluindo a farmacológica, biotecnológica e agrônômica (Zhelifonova et al., 2010). Os metabólitos secundários e compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos endofíticos estão intimamente relacionados com a competição direta por nutrientes e espaço com os patógenos, e, também, já são descritos como potenciais novos agentes de controle biológico (Segaran e Sathiavelu, 2019). Toppo et al. (2023) mostraram que isolados de *Penicillium* de diferentes espécies produziram vários metabólitos bioativos que apresentaram atividade antimicrobiana contra os fungos *Fusarium culmorum* e *Fusarium oxysporum* e Motlagh et al. (2022) demonstraram que no ensaio de compostos orgânicos voláteis, o *P. rubens* foi o mais eficiente no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc., agente causal da doença da podridão branca no caule do amendoim.

Para uma agricultura sustentável, a gestão e o controle das doenças são cruciais e a utilização de fungos endofíticos tem sido abordagem alternativa. Os experimentos de casa de vegetação revelaram que aplicação da suspensão de esporos de *Penicillium* sp. foi capaz de reduzir a progressão do mofo-branco após 7 dias da inoculação do patógeno, e também de reduzir a severidade da antracnose em plantas de feijão-comum. Os resultados obtidos corroboram a competência do *Penicillium* sp. em mitigar os danos causados por *S. sclerotiorum* e *C. lindemuthianum* em plantas de feijão-comum, indicando a viabilidade de seu uso como agente de biocontrole. Esses resultados são coerentes com estudos que caracterizaram a eficiência de *P. griseofulvum* na qual o fungo reduziu a severidade de doenças transmitidas pelo solo em 15 % (Li et al., 2019) e *Penicillium* sp. na supressão da decomposição induzida pela antracnose em frutos de tomate (Hassine et al., 2022). No mais, uma análise mais detalhada dos metabólitos secundários e os compostos orgânicos voláteis produzidos por *Penicillium* sp., e novas formas de aplicação do agente e sua interação com os patógenos podem proporcionar

informações adicionais sobre os mecanismos que promovem o controle biológico. Além disso, ensaios realizados em condições de campo são primordiais para validar a eficácia desse isolado em ambientes agrícolas.

O efeito estimulador de crescimento das plantas de feijão-comum pode ser atribuído à capacidade de *Penicillium* sp. em produzir fitohormônios, que são reguladores de quase todos os aspectos do desenvolvimento vegetal e também das respostas das plantas ao meio ambiente, especialmente o ácido indol acético e a giberelina. Os resultados obtidos são apoiados por estudos anteriores, conforme descrito por Khalil et al. (2021), isolados fúngicos de *Penicillium crustosum* EP-2 e *Penicillium chrysogenum* EP-3 mostraram ser produtores de ácido indol acético, além disso, quando inoculados em plantas de milho proporcionaram o aumento do comprimento da raiz. Leitão e Enguita (2016) descreveram que as espécies de *Penicillium* produtoras de giberelinas podem ajudar na regulação dos antioxidantes enzimáticos e na absorção de nutrientes pela planta.

Penicillium sp. também apresenta os diferentes mecanismos relacionados à promoção do crescimento, *in vitro*, como a produção de amônia, solubilização de fosfato e produção de sideróforos. Os resultados se correlacionam, uma vez que *Penicillium* sp. apresentou capacidade de aumentar o comprimento da parte aérea e raiz, massa seca da parte aérea e da raiz, e de aumentar a eficiência de utilização de P, N, Ca e Mg e eficiência de translocação de P. Mecanismos estes que fornecem às plantas as demandas de macro e micronutrientes, e conseqüentemente estimulam o crescimento das plantas, mais também aumentam a defesa da planta contra a colonização de patógenos e sua proteção as condições de estresses. Esses resultados são congruentes com estudos que demonstraram que o tratamento com *P. chrysogenum* e *P. crustosum* aumentou o crescimento de plantas de milho pela produção de amônia (Hassan, 2017). Além disso, o tratamento de plantas de milho com *Penicillium aculeatum*, que possui a capacidade de solubilizar fosfato, levou a um aumento significativo da biomassa da parte aérea e do teor de P nas plantas quando comparadas com o controle (sem inoculação) (Efthymiou et al., 2018).

A produção de enzimas contribui de diferentes maneiras para a agricultura, como no controle de fitopatógenos e pragas, e na promoção de crescimento vegetal. Enzimas como celulasas, amilases, quitinase, proteases, pectinases, lipases e β -glucanases por fungos endofíticos está intimamente relacionada com a competição direta por nutrição e espaço com patógenos, também com a colonização nas plantas hospedeiras e para a

quebra de diferentes fontes de carbono para facilitar o acesso e a degradação de reservatórios de nutrientes orgânicos (Segaran e Sathiavaleu, 2019). *Penicillium* sp. produz enzimas como amilases, pectinases e CMCase que estão relacionadas com o processo de colonização do endófito nas plantas, e em conjunto a isso, mostrou ter capacidade de colonizar as plantas de feijão-comum. Os resultados vão de encontro com dados da literatura, onde Kaur e Saxena (2023) descrevem que o fungo endofítico isolado das folhas do trigo, *P. citrinum*, exibiu atividades enzimáticas extracelulares (amilases, asparaginases, celulases, lacases e lipases) que contribuíram para adaptabilidade das plantas a estresses abióticos.

Conclusão

Penicillium sp. é um promissor agente de biocontrole para fitopatógenos do feijão-comum, como *S. sclerotiorum* e *C. lindemuthianum* e potencial promotor de crescimento vegetal com suas várias características, incluindo a capacidade de solubilização de fosfato, produção de fitohormônios, de amônia, de sideróforos e de enzimas extracelulares. Além disso, apresenta tolerância à concentração de 10 % de NaCl e melhora a eficiência de aquisição e translocação de alguns macros e micronutrientes. Adicionalmente, *Penicillium* sp. é capaz de inibir o crescimento de diferentes fitopatógenos em cultura dupla, por meio da produção de metabólitos secundários e compostos orgânicos voláteis. Embora a aplicação em condições de campo ainda necessite de investigações adicionais, este estudo proporciona uma contribuição significativa para a compreensão do potencial de *Penicillium* sp. como promotor de crescimento vegetal e como agente de biocontrole e estabelece um suporte para futuras pesquisas que visam a implementação desse microrganismo no desenvolvimento de formulações comerciais e conseqüentemente na agricultura.

Referência

- Araújo KS, Brito VN, Veloso TGR, Leite TS, Pereira OL, Mizubuti ESG, Queiroz MV (2018). Diversity of culturable endophytic fungi of *Hevea guianensis*: A latex producer native tree from the Brazilian Amazon. *African Journal of Microbiology Research*, 12(42):953–964. <https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8980>.
- Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Herre EA (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100(6):105649-15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>.
- Babu AG, Kim SW, Yadav DR, Hyum U, Adhikari M, Lee YS (2015). *Penicillium menonorum*: A Novel fungus to promote growth and Nutrient Management in Cucumber Plants. *Mycobiology*, 43(1):49-56. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.1.49>.
- Bhalla K, Singh SB, Agarwal R (2010). Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. *Environmental Monitoring and Assessment*, 167(1-4):515-520. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1068-5>.
- Bhatt SC, Debnath S, Pareek N (2016). Assessment of *Penicillium bilaii* inoculation in wheat (*Triticum aestivum* L.) for improving growth, yield and phosphorus availability in *Mollisols* of India. *Journal of Applied and Natural Science*, 8:358–367. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.800>.
- Cappuccino JC, Sherman N (1992). *Microbiology: a laboratory manual*. Longman, New York.
- Coleine C, Stajich JE, Selbmann L (2022). Fungi are key players in extreme ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*, 37(6):517-528. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.02.002>.
- Dennis C, Webster J (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1):25-39. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3).
- Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159(4):317-394. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.004>.
- Dias ES, Queiroz MV, Cardoso PG, Barros EG, Araújo EF (1999). Transformation of *Penicillium expansum* with a heterologous gene which confers resistance to benomyl. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15:513–514. <https://doi.org/10.1023/A:1008965113302>.
- Ding T, Jiang T, Zhou J, Xu J, Gao ZM (2010). Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Genetics and Molecular Research*, 26(9):2104-2112. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr809>.
- Efthymiou A, Grønlund M, Müller-Stöver DS, Jakobsen I (2018). Augmentation of the phosphorus fertilizer value of biochar by inoculation of wheat with selected

- Penicillium* strains. *Soil Biology and Biochemistry*, 116:139–147. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.006>.
- Felber AC, Orlandelli RC, Rhoden SA, Garcia A, Costa AT, Azevedo JL, Pamphile JA (2016). Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. *Annals of Microbiology* 66(2): 765-775. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1162-6>.
- Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnomoorthy AS, Savchuk SC (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5):955-964. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.021>.
- Galeano RMS, Silva SM, Yonekawa MKA, Guimarães NCA, Giannesi GC, Masui DC, Corrêa BO, Brasil MS, Zanoelo FF. (2023). *Penicillium chrysogenum* strain 34-P promotes plant growth and improves initial development of maize under saline conditions. *Rhizosphere* 26: 2452-2198. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100710>.
- Gasparotto L, Pereira JCR (2012). *Doenças da seringueira no Brasil*, 2ed. Embrapa. Brasília, Brasil. pp255.
- Gordon AS, Weber RP (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1):192-195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>.
- Hassan SE-D (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 8(6):687-695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>.
- Hassine M, Aydi-Bem-Abdallah R, Jabnoun-Khireddine H, Daami-Remadi M (2022). Soil-borne and compost-borne *Penicillium* sp. and *Gliocladium* spp. as potential microbial biocontrol agentes for the suppression of antracnose- induced decay on tomato fruits. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(20). <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00519-5>.
- Hossain DM, Sultana F, Kubota M, Koyama H, Hyakumachi M (2007). The Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 Induces Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Activation of Multiple Defense Signals. *Plant and Cell Physiology*, 48(12):1724-1736. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm144>.
- Ikram M, Jan G, Jan FG, Rahman IU, Iqbal A, Hamayun M (2018). IAA producing fungal endophyte *Penicillium roqueforti* Thom., enhances stress tolerance and nutrients uptake in wheat plants on heavy metal contaminated soils. *Plos One*,13(11): e0208150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208150>.
- Kaur R, Saxena S (2023). *Penicillium citrinum*, a Drought-Tolerant Endophytic Fungus Isolated from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves with Plant Growth-Promoting Abilities. *Current Microbiology*, 80(5):184. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03283-3>.
- Khalil AMA, Hassan SE-D, Alsharif SM, Eid AM, Ewais EE-D, Gobouri AA, Elkelish A, Fouda A (2021). Isolation and characterization of fungal endophytes isolated from medicinal plant *Ephedra pachyclada* as plant growth-promoting, *Biomolecules* 11(2):140. <https://doi.org/10.3390/biom11020140>.

- Khan AL, Hamayun M, Ahmad N, Hussain J, Kang S-M, Kim Y-H, Adnan M, Tang D-S, Waqas M, Radhakrishnan R, Hwang Y-H, Lee I-J (2011). Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max* L. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(9):893-902. <https://doi.org/10.4014/jmb.1103.03012>.
- Khan AL, Lee IJ (2013). Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. *BMC Plant Biology* 13:86. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-86>.
- Khan S, Hamayun M, Yoon H, Kim H-Y, Suh S-J, Hwang S-K, Kim J-M, Lee I-J, Choo Y-S, Kong W-S, Lee B-M, Kim J-G (2008). Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology* 8:231. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-231>.
- Leitão AL, Enguita FJ (2016). Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological Research*, 183: 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.004>.
- Loper JE, Schroth MN (2008). Influence of Bacterial Source of Indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Physiology and Biochemistry*, 76:386-389. <http://doi.org/10.1094/Phyto-76-386>.
- López JE, Gallego JL, Vargas-Ruiz A, Peña-Mosquera AL, Zapata-Zapata AD, López-Sánchez IJ, Botero-Botero LR (2020). *Aspergillus tubingensis* and *Talaromyces islandicus* Solubilize Rock Phosphate Under Saline and Fungicide Stress and Improve *Zea mays* Growth and Phosphorus Nutrition. *Journal of Soil and Plant Nutrition*, 20:2490-2501. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00315-w>.
- Li Y, Guo Q, Wei X, Xue Q, Lai H (2019). Biocontrol effects of *Penicillium griseofulvum* against monkhood (*Aconitum carmichaelii* Debx.) root diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5):1532-1545. <https://doi.org/10.1111/jam.14382>.
- Ma Y, Chang ZZ, Zhao JT, Zhou MG (2008). Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper. *Biological Control* 44(1): 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.005>.
- Mavrevski R, Traykov M, Trenchev I, Trencheva M (2018). Approaches to modeling of biological experimental data with GraphPad Prism software. *WSEAS Transactions on Systems and Control*, 13:242-247.
- Mayende L, Wilhelmi BS, Pletschke BI (2006). Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9):2963-2966. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.03.019>.
- Motlagh MRS, Farokhzad M, Kaviani B, Kulus D (2022). Endophytic Fungi as Potential Biocontrol Agents against *Sclerotium rolfsii* Sacc._The Causal Agent of Peanut White Stem Rot Disease. *Cells*, 11(17):2643. <https://doi.org/10.3390/cells11172643>.
- Nautiyal CS (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1):265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.

- Park Y-II, Gander JE (1998). Choline Derivatives Involved in Osmotolerance of *Penicillium fellutanum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1):273-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.1.273-278.1998>.
- Petrini O (1991). Fungal Endophytes of Tree Leavez. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds) *Microbial Ecology of Leaves*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9.
- Pitt JI, Samson RA, Frisvad JC (2000). List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Samsin RA, Pitt JI (eds) *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp9-79.
- Qi X, Li X, Zhao J, Li Y, Zhang T, Wang S, Yu L, Xie Y (2019). GKK1032C, a new alkaloid compound from the endophytic fungus *Penicillium* sp. CCCC 400817 with activity against methicillin-resistant *S. aureus*. *The Journal of antibiotics* 72(4): 237. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0144-5>.
- Rojas EC, Jensen B, Jorgensen HJL, Latz MAC, Esteban P, Collinge DB (2022). The Fungal Endophyte *Penicillium olsonii* ML37 Reduces Fusarium Head Blight by Induced Resistance in Wheat Spikes. *Journal of Fungi*, 8(4):345. <https://doi.org/10.3390/jof8040345>.
- Salehghamari E, Tahmaseb M, Nasrollahzadeh Z, Amoozegar M (2019). Pectinase enzyme from *Streptomyces coelicoflavus* GIAL86 isolated from Meyghan Salt Lake, Arak, Iran. *Internacional Journal of Aquatic Biology*, 7(2). <https://doi.org/10.22034/ijab.v72.481>.
- Sarruge JC, Haag HP (1974). *Análise química de plantas*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), 56p.
- Schwyn B, Neilands JB (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1):47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Segaran G, Sathivelu (2019). Fungal endophytes: A potent biocontrol agente and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21:101284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>.
- Slama HB, Cherif-Silini H, Bouket AC, Qader M, Silini A, Yahiaoui B, Alenezi FN, Luptakova L, Triki MA, Vallat A, Oszako T, Rabet ME, Belbahri L (2019). Screening for Fusarium Antagonistic Bacteria From Contrasting Niches Designated the Endophyte *Bacillus halotolerans* as Plant Warden Against *Fusarium*. *Frontiers in Microbiology*, 9:3236. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>.
- Toghueo RMK, Boyom FF (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3Biotech*, 10:107. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>.
- Tolêdo-Souza ED, Costa JLS (2003). Inoculation methods of common bean seedlings for evaluation of germoplasm resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 33(2):57.
- Tom RA, Crisan EV (1975). Assay for lipolytic and proteolytic activity using marine

- substrates. *Applied Microbiology*, 29(2):205-210. <https://doi.org/10.1128/am.29.2.205-210.1975>.
- Toppo P, Kagatay LL, Gurung A, Singla P, Chakraborty R, Roy S, Mathur P (2023). Endophytic fungi mediates production of bioactive secondary metabolites via modulation of genes involved in key metabolic pathways and their contribution in diferente biotechnological sector. *3 Biotech*, 13(6):191. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03605-z>.
- Vale FXR, Parlevliev JE, Zambolim L (2001). Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, 26:577-589. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000300001>.
- Venables WN, Smith DM (2009). An introduction to R. The R Development Core Team.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong S-B, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 63–139. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- Wang Y, Wang G, Wang L, Xu X, Xia J, Huang X, Wu Y, Zhang C (2010). Isolation and identifcation of an endophytic fungus of *Polygonatum cyrtonema* and its antifungal metabolites. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50(8):1036–1043.
- Yuan Y, Feng H, Wang L, Li Z, Shi Y, Zhao L, Feng Z, Zhu H (2017). Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against *Verticillium* Wilt disease. *Plos One* 12(1):e0170557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170557>.
- Zhang S, Gan Y, Xu B (2019). Mechanisms of the IAA and ACC-deaminase producing strain of *Trichoderma longibrachiatum* T6 in enhancing wheat seedling tolerance to NaCl stress. *BMC Plant Biology*, 19 (22). <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1618-5>.
- Zhelifonova VP, Antipova TV, Kozlovsky AG (2010). Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. *Microbiology*, 79(3):277-286. <https://doi.org/10.1134/S002626171003001X>.
- Zheng YK, Miao CP, Chen HH, Huang F-F, Xia Y-M, Chen Y-W, Zhao L-X (2017). Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: Diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease. *Journal of Ginseng Research*, 41: 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.07.005>.

Material Suplementar

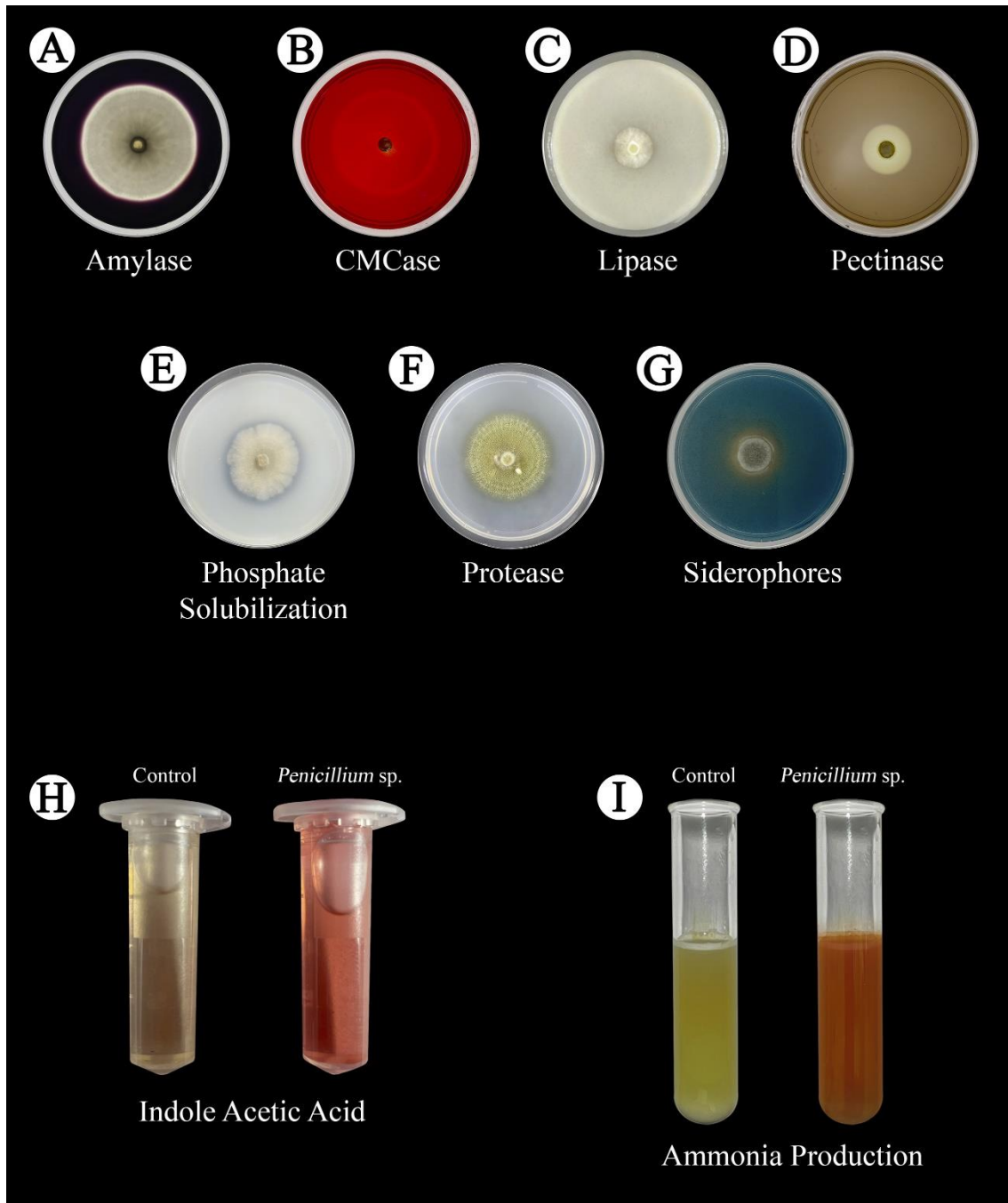
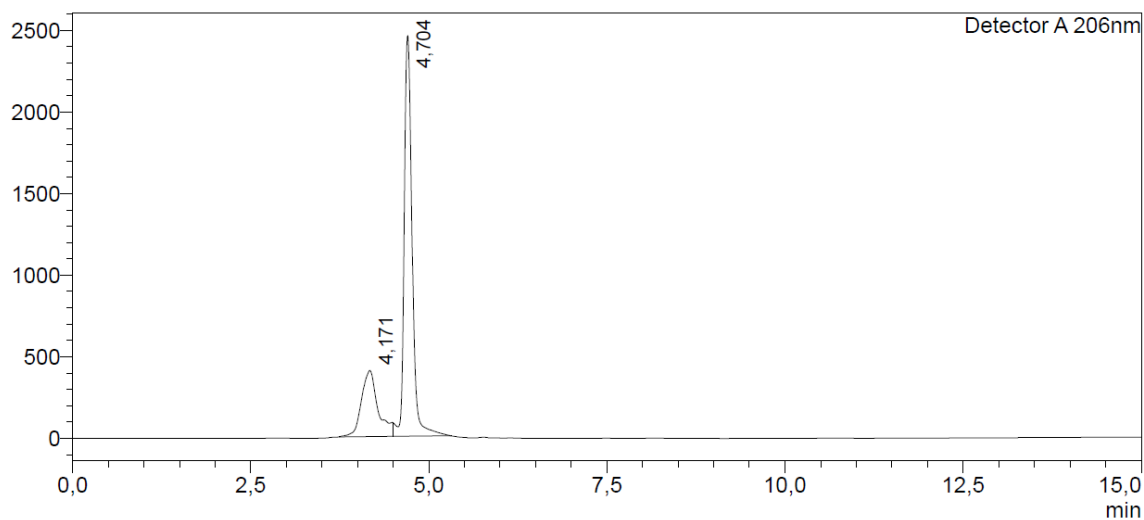


Figura Suplementar S1: Ensaio para detecção de indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vitro* pelo fungo *Penicillium* sp. (A) Produção de amilase, (B) Produção de CMCCase, (C) Produção de lipase, (D) Produção de pectinase, (F) Produção de protease. A presença visual de halos ao redor da colônia fúngica indica a ação da enzima específica na degradação de diferentes substratos. A formação dos halos demonstra a atividade da amilase, CMCCase, lipase, pectinase e protease pelo *Penicillium* sp. (E) Solubilização de fosfato, a presença visual do halo ao redor da colônia fúngica indica a capacidade de solubilizar o fosfato presente no meio. (G) Produção de sideróforos, a presença visual do halo de coloração amarela ao redor da colônia fúngica indica a capacidade de quelar o ferro presente no meio. (H) Produção

de ácido indol acético, a mudança de coloração do meio de cultura de amarelo para rosa-alaranjado indica a produção do fitohormônio e **(I)** Produção de amônia, a mudança de coloração do meio de cultura de amarelo para laranja-marrom indica resultado positivo para a produção.

<Chromatogram>

mV



<Peak Table>

Detector A 206nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	4,171	6529920	404616	2289,213	ug/mL	M	GA3
2	4,704	18822368	2451699	0,000		V M	
Total		25352289	2856315				

Figura Suplementar S2: Cromatograma de HPLC, na qual foi usado GA3 comercial como padrão de giberelina na concentração de 1 µg/mL. O primeiro pico representa a produção de giberelina GA3 (tempo de retenção 4,171) pelo fungo endofítico *Penicillium* sp.

Capítulo 2: Desvendando o genoma e os metabólitos secundários produzidos por *Penicillium* sp. endofítico de *Hevea brasiliensis* (seringueira) da floresta amazônica brasileira.

RESUMO

Penicillium sp. é um fungo endofítico de *Hevea brasiliensis* (seringueira) recentemente descrito, com potencial para aplicação biotecnológica. É apresentada neste estudo a avaliação do genoma de *Penicillium* sp. e a caracterização dos metabólitos secretados em meio de cultura. O genoma apresenta 35.637.581 pb, que estão distribuídos em 20 *scalffolds* e foram preditos 11.300 genes. A análise com o BUSCO mostrou que o genoma tem completude de 96,1%. Por meio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi possível detectar a presença de quatro cromossomos. Foram identificados genes que codificam 508 CAZymes, transportadores de alta afinidade de glicose, maltose permease, transportadores de colina e sideróforos, transportadores do tipo MFS e permease de aminoácidos aromático e neutro, além de 47 *clusters* de genes biossintéticos de metabólitos secundários. Os estudos químicos e estratégias de desreplicação guiadas por HRMS-MS, conduziram à identificação de 14 compostos após procedimentos cromatográficos: Andrastina A, Andrastina B, Andrastina C, Andrastina D, 15-desacetilado citreohibridona E, ácido androst-11,15-dieno-14-carboxílico, 3,15,19-triidroxi-4,4,8,12,16-pentametil-17-oxo-, éster metílico, Simplicissima, Simplicilliumtide D, Simplicilliumtide E, cido lucidênico O, análogo de Andrastina A e 3 compostos não identificados. Sendo que o *cluster* para Andrastina A foi identificado no genoma e o composto foi produzido por *Penicillium* sp. nas condições de cultivo testadas. Portanto, tomando em conjunto, este trabalho contempla detalhes sobre o genoma completo e o perfil químico de *Penicillium* sp., com perspectivas de fornecer recursos para obtenção de produtos naturais promissores no controle biológico de microrganismos fitopatogênicos.

Palavras-chave: genoma fúngico, *Penicillium* sp., sequenciamento de *long reads*, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), mineração do genoma; metabólitos secundários.

Introdução

O gênero *Penicillium*, descrito inicialmente por Link (1809), desempenha um papel significativo tanto no ambiente natural quanto nas atividades humanas relacionadas à pesquisa e à produção. Sendo um dos gêneros de fungos mais extensos e difundidos, *Penicillium* abrange atualmente 483 espécies reconhecidas (Visagie et al., 2014; Torres-Garcia et al., 2022), exibindo estilos de vida diversos, envolvendo saprófitas, patógenos e endófitos capazes de se desenvolver em amplo espectro de condições ambientais. Entre as centenas de espécies do gênero *Penicillium*, muitas estão envolvidas na decomposição saprofítica de materiais orgânicos. Vários estudos mostram que algumas espécies de *Penicillium* podem apresentar impactos negativos à agricultura como patógenos (Luciano-Rosário et al., 2020; Kanashiro et al., 2020; Wang et al., 2021), enquanto alguns podem promover e melhorar o crescimento das plantas (Tarroum et al., 2022; Kaur e Saxena, 2023; Suraby et al., 2023) e controlar fitopatógenos (Yuan et al., 2021; Zhao et al., 2021; Lichtner et al., 2022). As espécies de *Penicillium* também podem ser aplicadas na indústria alimentícia e farmacêutica, a exemplo da produção de queijos (Ye et al., 2024) e de embutidos fermentados (Lee et al., 2022) e da produção de penicilina (Torngvist e Peterson, 1956), respectivamente.

Devido as tecnologias novas e mais rápidas, o número de genomas de fungos sequenciados está aumentando. Isto permite estudos comparativos dos genomas de organismos com papéis importantes na saúde, biotecnologia ou agricultura. Entre esses organismos interessantes estão espécies do gênero *Penicillium*. Até o momento, 30 genomas de *Penicillium*, entre 18 espécies foram sequenciados, montados e anotados, incluindo *P. arizonense* (Grijseels et al., 2016), *P. brasilianum* (Zhang et al., 2018), *P. chrysogenum* (Berg et al., 2008), *P. crustosum* (Yin et al., 2021), *P. digitatum* (Julca et al., 2015; Marcet-Houben et al., 2012), *P. expansum* (Ballester et al., 2015; Li et al., 2015; Yu et al., 2014), *P. griseofulvum* (Banani et al., 2016), *P. marneffeii* (Woo et al., 2011), *P. maximae* (Yin et al., 2021), *P. oxalicum* (Pham et al., 2023), *P. roqueforti* (Cheeseman et al., 2014), *P. rubens* (Gauthier et al., 2023), *P. simplicissimum* (Fisher et al., 2022) e *P. solitum* (Eldarov et al., 2012).

Os fungos endofíticos são reconhecidos como microrganismos que passam toda ou parte da sua vida colonizando tecidos vegetais inter e/ou intracelularmente sem causar quaisquer sintomas aparentes de doença (Petrini, 1991; Aly et al., 2011). Muitos fungos

endofíticos possuem alto potencial de produção de metabólitos estruturalmente diversos, alguns dos quais são valiosos para aplicações medicinais e agrícolas (Gouda et al., 2016). O gênero *Penicillium* é um dos maiores grupos de fungos, e muitas das espécies deste gênero foram isoladas como endofíticas de diferentes plantas (Toghueo e Boyom, 2020). Espécies de *Penicillium* endofíticas possuem a capacidade de proteger as plantas contra estresses bióticos e também de promover o crescimento das plantas por meio da produção de metabólitos secundários (Waqas et al., 2015; Hassan 2017).

As espécies de *Penicillium* são conhecidos por serem produtores de metabólitos secundários com diferentes estruturas, incluindo policetídeos, peptídeos não ribossômicos, terpenóides e alcaloides, que apresentam diversas atividades biológicas (Zang et al., 2021). Novos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos filamentosos, como as espécies do gênero *Penicillium*, têm sido continuamente descobertos. Um desses metabólitos são os meroterpenóides, uma classe de produtos naturais que são formados a partir de policetídeos e precursores de terpenóides (Duan et al., 2016; Qin et al., 2020). Existem diversos relatos na literatura sobre a produção de meroterpenóides por fungos endofíticos do gênero *Penicillium* e suas atividades biológicas. Duan et al (2016) identificaram meroterpenóides produzidos pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. T2-8 que exibem atividades antimicrobianas. *Penicillium* sp. NR-1 produz meroterpenóides que podem ser agentes anti-diabéticos tipo 2 menos tóxicos (Sofian et al., 2023) e *Penicillium* sp. sh18 produz dois tipos de meroterpenóides com atividade antitumoral (Tang et al., 2019).

Araújo et al. (2018) isolaram e analisaram a diversidade de fungos endofíticos de folhas, caules e raízes de árvores de *Hevea brasiliensis* da floresta amazônica brasileira. Dentre os fungos isolados, mereceu destaque *Penicillium* sp. pelo potencial de produção de metabólitos de interesse para a indústria e para o desenvolvimento sustentável do agronegócio. Além disso, como mostrado no capítulo anterior, *Penicillium* sp. é um agente de biocontrole para fitopatógenos do feijão-comum e promotor de crescimento vegetal. Portanto, neste estudo é apresentada a análise do genoma de *Penicillium* sp. e do seu perfil químico.

Material e Métodos

Isolado de fungo, sequenciamento de DNA e montagem completa do genoma

O isolado *Penicillium* sp. 658F5R-AM foi obtido de seringueira (*Hevea brasiliensis*) da Floresta Amazônica brasileira (Araújo et al. 2018). Esse isolado foi depositado na coleção do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (LGMM) da Universidade Federal de Viçosa e foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SisGen, com acesso A3DE980 e o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* Ss15B pertence à coleção do LGMM.

Penicillium sp. foi cultivado sobre disco de papel celofane colocado sobre meio ágar batata dextrose (BDA) a 28 °C por 24h. O micélio foi coletado com uma espátula e utilizados para extração de DNA genômico (Specht et al., 1982). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foi avaliada usando eletroforese em gel de agarose (Sambrook, 2001) e ensaio Qubit usando um fluorômetro Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos), respectivamente. O genoma de *Penicillium* sp. foi sequenciado com a tecnologia de *long reads*, Oxford Nanopore PromethION pela BGI Genomics (San Jose - Estados Unidos).

A montagem *de novo* do genoma foi executada utilizando o software Flye versão 2.9.3-b1797 (Kolmogorov et al., 2019) usando *long reads* do ONT bruto (--nano raw) e método de *scaffold* (--scaffold) com cinco iterações de polimento (-- iterações 5), considerando estimativa de tamanho do genoma de 30 Mb (-- tamanho do genoma 30m).

A predição e anotação do genoma seguiu o *pipeline* do Funannotate versão 1.8.15 (Palmer e Stajich, 2019) e combinou métodos *ab initio* e baseados em evidências, usando homologia com proteínas conhecidas para predição genética. Primeiro, o Repeat-Modeler versão 2.0.1 (Flynn et al., 2020) executou uma previsão *ab initio* de elementos transponíveis (TEs) e elementos repetitivos para produzir uma biblioteca a partir dos *scaffolds*. Então, o RepeatMasker versão 4.1.11s (Tarailo-Graovac e Chen, 2009) executou um mascaramento suave desses elementos nas sequências de *scaffolds* usando a biblioteca prevista. Após o mascaramento repetido, a ferramenta “predict” do Funannotate foi usada para prever os genes usando sequências de proteínas do gênero *Penicillium* (taxonomia ID 5073) disponíveis na UniProt Knowledgebase (UniProtKB; <https://www.uniprot.org/>; acessado em 15/01 /2024). Além disso, a versão 0.9 do Barrnap

([//github.com/tseemann/barrnap](https://github.com/tseemann/barrnap)) foi usada para prever os genes do RNA ribossômico, selecionando o reino Eukarya e um limite de valor de $1e^{-10}$ para filtrar os alinhamentos significativos. O BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Simão et al., 2015) foi usado para avaliar a completude do genoma usando o modo proteoma e o conjunto de dados ortólogos da ordem Eurotiales (eurotiales_odb10).

As anotações funcionais das sequências codificadoras de proteínas previstas foram realizadas por meio de atribuições de ortologia usando o eggNOG-Mapper versão 2 (Cantalapiedra et al., 2021), no qual os modelos de proteínas foram classificados de acordo com Gene Ontology (GO), Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) e dados Pfam. As anotações GO incluíram 2 camadas que descrevem em grupos funcionais o papel da proteína nas funções biológicas e os termos KEGG foram divididas em 4 níveis, sendo o terceiro e quarto níveis as vias biossintéticas específicas e os genes regulados em cada via, respectivamente.

Para anotar e identificar proteínas secretadas foi utilizado o SignalP 5.0 (Armenteros et al., 2019) e o TMHMM v 2.0 (Krogh et al., 2001) para prever o peptídeo sinal e domínios transmembrana (PredHel <2). A previsão de transportadores foi realizada por meio de buscas de similaridade usando a ferramenta BLASTp para procurar supostos homólogos no Banco de Dados de Classificação de Transportadores (TCDB) (Saier et al., 2006). A anotação de enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) foi realizada usando o banco de dados CAZy empregando o meta-servidor dbcan3 com diamond e hmmscan em <https://bcb.unl.edu/dbCAN2/> (Zheng et al. 2023). Para predição de *clusters* de genes biossintéticos (BGCs), o genoma foi submetido à plataforma FungiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>), acessada em 15 de março de 2024.

Preparação de DNA cromossômico intacto e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Penicillium sp. foi cultivado sobre disco de papel celofane colocado sobre meio ágar batata dextrose (BDA) a 28 °C por 14h. O micélio foi coletado com uma espátula e utilizado para preparação de protoplastos. Os protoplastos foram obtidos conforme método proposto por Dias et al. (1999) com modificações. Um volume de 5 ml de estabilizador osmótico (tampão fosfato 10 mM, KCl 0,6 M, pH 5,8) e 30 mg de Lysing Enzymes L1412 (SIGMA®) foram adicionados a 800 mg de micélio e incubado a 80 rpm

e 30 °C por um período de 3-4h. Os protoplastos foram filtrados utilizando uma seringa com gaze e centrifugados a 5.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 5 mL de estabilizador osmótico (KCl 0,8 M em tampão fosfato 0,01 M, pH 5,8). Essa etapa foi repetida mais uma vez e o precipitado foi ressuspenso em tampão ST (sorbitol 1 M; Tris-HCl, 0,01 M, pH 7,5). Os protoplastos foram contados e diluídos até uma concentração final de 1×10^8 protoplastos/mL⁻¹. Um volume igual de 2,0% de agarose InCert (FMC) em tampão ST pré-aquecido a 42 °C foi adicionado à suspensão de protoplastos e a mistura foi vertida em um molde de *plugs* e colocada a 4 °C durante 10 min. Os *plugs* contendo os protoplastos foram tratados em 1 mL de solução NDS [EDTA 50 mM (pH 8,0); Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); 1% de N-lauroil sarcosina] e 1 mg mL⁻¹ de proteinase K e incubados durante a noite a 50 °C. Os *plugs* foram transferidos para tubos com 5 mL de solução de EDTA 50 mM (pH 8,0) e colocados a 50 °C por 30 min. Essa etapa foi repetida e os *plugs* foram transferidos para tubos contendo 5 mL de EDTA 50 mM pH 8,0 e armazenados a 4 °C. A PFGE foi realizada utilizando um sistema CHEF-DR III (Campos Elétricos Homogêneos Fixados - Regulação Dinâmica) (Bio-Rad).

Dois programas foram utilizados para separar os cromossomos de *Penicillium* sp. O Programa A foi empregado para separar os pequenos cromossomos usando pulsos em bloco: 60/120 s, 24h, 6 V cm⁻¹ em um ângulo incluído de 120°. O gel foi preparado com 1,5% (p v⁻¹) de Ultra Pure DNA Grade agarose (Bio-Rad) em 0,5 X TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0). O tampão foi mantido em circulação a 10°C. Os cromossomos de *Schizosaccharomyces pombe* (Bio-Rad, EUA) e *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad, EUA) foram separados em paralelo como marcadores de tamanho padrão. O programa B foi utilizado para separar os grandes cromossomos usando pulsos divididos em três blocos: B1 foi conduzido em 8.400-13.000 s, 75h e 1,4 V cm⁻¹; B2 em 3300-5400 s, 90h e 1,4 V cm⁻¹; e B3 em 2000-2700 s, 45h e 1,4 V cm⁻¹ em um ângulo incluído de 120°. O gel foi preparado com 0,8% (p v⁻¹) de Ultra Pure DNA Grade agarose (Bio-Rad) em 1X TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2,0 mM, pH 8,0). O tampão foi substituído a cada 72h e mantido em circulação a 10°C. Os cromossomos de *S. pombe* (Bio-Rad, EUA) e *Aspergillus nidulans* (Queiroz et al., 2000; Teixeira et al., 2014) foram executados em paralelo como marcadores de tamanho padrão. Em ambas as corridas, 200 µM de tiourea foram adicionados ao gel de agarose e ao tampão de eletroforese para garantir a degradação mínima do DNA (Fawley e Wilcox, 2002). Após a separação dos

cromossomos, o gel foi corado com brometo de etídio ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizado em sistema de documentação de gel 1-PIX (Locus Biotechnology).

Extração de metabólitos secundários secretados em meio líquido

Penicillium sp. foi previamente cultivado em meio BDA a 28°C por 5 dias e foi preparada uma suspensão de conídios na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} . Foram adicionados 4 mL dessa suspensão em 200 mL de meio batata dextrose (BD) e incubados à 28°C por 15 dias. Após 15 dias, foi realizada filtração à vácuo separando o micélio do meio líquido BD.

O micélio foi transferido para um erlenmeyer de 100 mL e foram adicionados 50 mL de metanol e deixado em repouso por 6 horas na cabine de exaustão. Nesse intervalo de 6h, o micélio foi triturado com um bastão de vidro de hora em hora. Após esse período, o micélio triturado associado ao metanol foi filtrado. No extrato metanólico foram adicionados 20 g de sulfato de sódio para retirar o excesso de água residual e este extrato foi filtrado e submetido a rotaevaporação a 64°C para volatilização do metanol (Carvalho et al., 2023).

O meio líquido BD foi transferido para o funil de separação e para cada 200 mL de meio líquido BD foram adicionados 100 mL de acetato de etila. Foi coletada a fase orgânica. Na fase aquosa, foi adicionado mais duas vezes o mesmo volume de acetato de etila e coletada a fase orgânica novamente. Depois de coletar toda fase orgânica, foram adicionados 20 g de sulfato de sódio para retirar o excesso de água e a fase orgânica foi filtrada. O extrato de acetato de etila foi submetido a rotaevaporação a 77°C para volatilização do acetato de etila (Carvalho et al., 2023).

Extração de metabólitos secundários secretados em meio sólido em cultura dupla

A avaliação do potencial antagônico do fungo foi realizada por meio do método de cultura dupla, adaptado de Dennis e Webster (1971). Inicialmente, o isolado foi inoculado em um lado da placa de Petri contendo meio de cultura BDA, onde foi depositado um disco de micélio a 1,5 cm da borda da placa. Após 24h, no lado oposto, foi inoculado o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*. Na cultura dupla foram realizados recortes em regiões específicas do meio com as culturas para avaliar os metabólitos produzidos (Figura 8). Em um tubo de 50 mL foram adicionadas as regiões do meio de

cultura separadamente e 10 mL de acetato de etila. O material foi sonificado por 5 minutos, filtrado e centrifugado à 10.000 rpm por 15 minutos. O extrato de acetato de etila foi seco em banho seco à 77 °C (Carvalho et al., 2023).

Análise HPLC-HRMS

As amostras foram solubilizadas em 1 mL de metanol (MeOH grau HPLC) e centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para vial de 1,5 mL, sendo cada amostra posteriormente analisada em sistema de cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS). O equipamento abrange um cromatógrafo líquido Nexera X2 (Shimadzu, Japão) com detector de arranjos de diodos (DAD) - SPD M20A acoplado a um espectrômetro com analisador tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (QTOF), MicroTOF-QII (Bruker Daltonics, EUA), equipado com fonte *eletrospray* (ESI), operando no modo positivo de ionização, com tempo de transferência de íons de 70 μ s e prepulse de 5 μ s. O intervalo de massas selecionado foi de m/z 50-1200, modo AutoMS, com energia de colisão variando de 20 - 65 eV de acordo com m/z 50-700, mantendo-se a energia constante em 65 eV para valores de massa acima de m/z 700. Foi adquirido o máximo de cinco íons precursores por ciclo. Os parâmetros de funcionamento do equipamento foram: capilar 4500 V, gás nebulizador (nitrogênio) 4 bars, gás secante (nitrogênio) 9,0 L/min, temperatura da fonte 200 °C. Para calibração interna do sistema foi utilizada solução de formiato de sódio 10 nM em isopropanol/água (1:1 v/v). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica Kinetex C18 (100 x 2,1mm, 2.6 μ m) (Phenomenex, EUA) mantida em 50 °C, com vazão de 0,35 mL/min. A fase móvel (A) foi constituída de água de-ionizada enquanto a fase (B) constituída de acetonitrila, ambas grau HPLC, contendo 20 mM de ácido fórmico como aditivo. Inicialmente foi aplicada eluição isocrática de 0-2 min em 15 % de (B), com posterior gradiente de eluição de 2-12 min de 15 % até 95 % de (B) e novamente eluição isocrática de 12-17 min à 95 % de (B). 5 μ L de amostra foram injetados em cada análise.

Desreplicação via GNPS

Para a desreplicação através dos espectros obtidos de MS/MS via análise de rede molecular (GNPS), os quais foram adquiridos utilizando-se o modo AutoMS e convertidos para o formato .mzXML utilizando-se o software MS-Convert, que faz parte

do ProteoWizard (Palo Alto, CA, EUA). As redes foram geradas usando a plataforma online (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>). Todos os picos de MS/MS que atingiram desvios de 17 Da dos íons precursores foram filtrados. Os espectros de MS/MS foram selecionados apenas entre os seis melhores picos, considerando uma faixa de 50 Da em todo o espectro. Os dados foram agrupados com uma tolerância de 0,02 Da para íons precursores e 0,02 Da para íons fragmentos na construção de espectros de “consenso” para cada precursor, que são combinados para criar o nó a ser visualizado. Espectros de consenso com menos de dois espectros não foram considerados. Conexões entre nós foram filtradas para valores maiores que 0,7 do parâmetro cosseno, com compatibilidade para mais de seis picos. Pela desrepliação de compostos, os espectros de rede gerados foram consultados nas bibliotecas GNPS, usando o mesmo critério de seleção para as amostras analisadas. Os dados do GNPS foram analisados e visualizados usando o Cytoscape 3.8.0 (Instituto Nacional de Ciências Médicas Gerais dos EUA, Bethesda, MD, EUA).

Desrepliação manual

Para desrepliação manual, foram obtidos os espectros de MS/MS dos extratos do meio líquido e da cultura dupla e analisados com auxílio do software (Bruker). De forma complementar, o banco de dados Atlas of Natural Products e referências da literatura foram usadas para buscas das massas acuradas e padrões de fragmentação iguais ou semelhantes aos obtidos nos espectros MS/MS, a fim de identificar compostos conhecidos ou possíveis análogos.

Resultados

Características gerais do genoma

O sequenciamento do genoma de *Penicillium* sp. produziu 1.003.355 *long reads*, representando uma cobertura de 160 ×, com um N50 de 3.813.483 pares de bases (pb). O genoma montado possui um tamanho total de 35.637.581 pb e 20 *scaffolds*, sendo o maior com 6.853.749 pb e o menor com 1.052 pb; 50 % do tamanho do genoma é coberto por apenas 4 *scaffolds* (L50=4), indicando que a montagem é altamente contínua. Além disso, o genoma completo de *Penicillium* sp. apresentou um conteúdo GC de 49,14 % e 5,4 % do tamanho do genoma é composto por regiões repetitivas. Um total de 11.300 genes foram preditos, sendo a região codificadora representando 16.003.652 pb e tendo 44,9 %

de conteúdo GC. Destes 11.300 genes, incluíram 11.111 sequências codificadoras de DNA (CDSs), 10 RNAs ribossômicos (rRNAs) e 179 RNAs de transferência (tRNAs) (Tabela 1).

O controle de qualidade da predição genética foi realizado utilizando o BUSCO, que avaliou a integridade do genoma detectando a presença de 4.191 genes de eucariotos, sendo 4.026 genes completos. Dos genes completos, 4.015 são de cópia única e 11 são genes duplicados. Além disso, de todos os genes encontrados, 70 genes estavam na versões fragmentadas e 95 genes estavam faltando.

Tabela 1: Descrição da montagem do genoma de *Penicillium* sp.

Descrição	Valores
Tamanho total da montagem	35.637.581 pb
Cobertura do sequenciamento	160×
Número de <i>scaffolds</i>	20
Maior <i>scaffolds</i>	6.853.749 pb
Menor <i>scaffolds</i>	1.052 pb
L50	4
N50	3.813.483 pb
Conteúdo CG do genoma	49,14 %
Sequências repetitivas	1.904.093 pb (5,34 %)
Números de genes	11.300
Região codificadora	16.003.652 pb (44,91 %)
Conteúdo GC da região codificadora	53,80 %
Sequência codificadora de DNA (CDSs)	11.111
RNAs ribossômicos (rRNAs)	10
RNAs de transferência (tRNAs)	179
Avaliação BUSCO (eurotiales_odb10)	4.191 esperado BUSCOs
Completo (C)	4.026 (96,1 %)
Completo e cópia única (S)	4.015 (95,8 %)
Completo e duplicado (D)	11 (0,3 %)
Fragmentado (F)	70 (1,7 %)
Faltando (M)	95 (2,2 %)

Para análise GO, 9.758 genes, representando 86,5 % do total de genes anotados, foram atribuídos às três categorias gerais do GO: componente celular, função molecular e processo biológico. A fim de entender as principais funções biológicas e as interações genéticas de *P. hevea* sp. nov., uma anotação do banco de dados via KEGG foi realizada e foram identificados 4.446 genes, representando 40,0 % do total de genes previstos, atribuídos em 4 níveis principais, incluindo 411 vias KEGG (Figura 1 e Tabela Suplementar S1). Desses quatro níveis principais, o metabolismo, como o metabolismo de carboidratos, foi o maior (1.417; 31,8 %), seguido pelos processos celulares, como transporte e catabolismo (744; 16,7 %), processamento de informações genéticas, como tradução (718; 16,1 %) e processamento de informações ambientais, como transdução de sinal (453; 10,1 %). Assim, grande parte dos genes do genoma de *Penicillium* sp. está relacionado com processos metabólicos significativos.

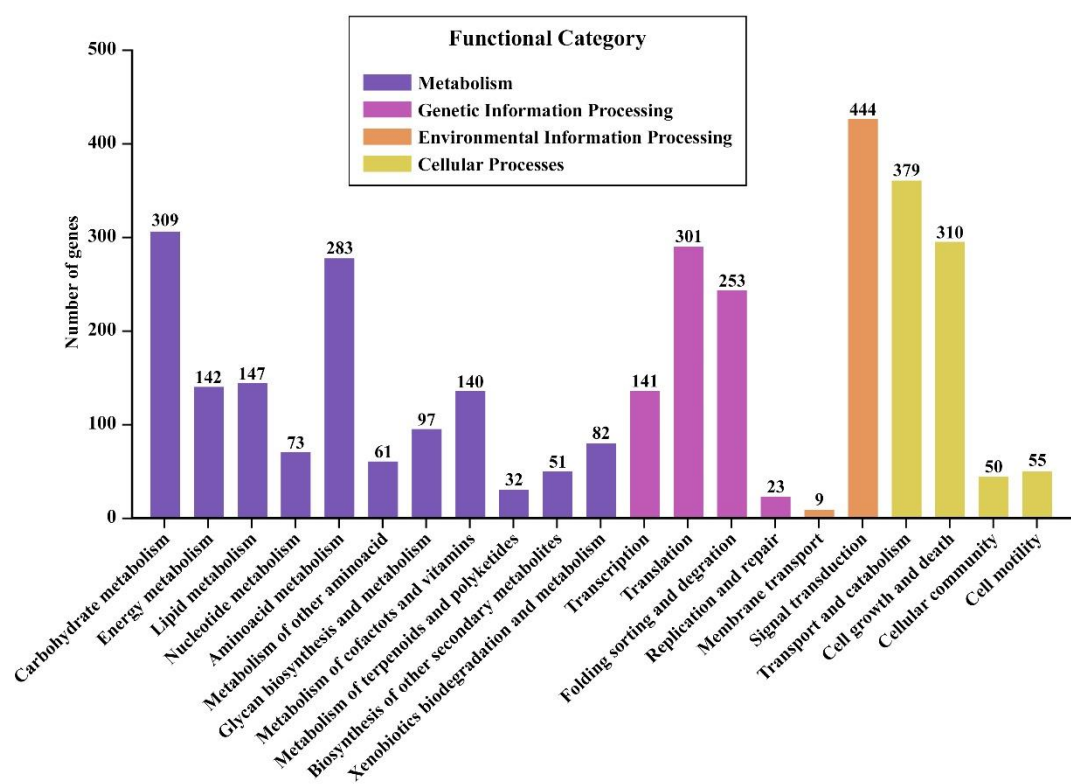


Figura 1: Anotação funcional da via KEGG de genes previstos no genoma de *Penicillium* sp. O mapa da via KEGG inclui o número de genes e seu envolvimento no metabolismo (barra roxo), processamento de informação genética (barra laranja), processamento de informação ambiental (barra verde) e processos celulares (barra azul). Os números no topo das barras mostram o número de genes atribuídos a cada termo da via KEGG.

Aproximadamente 9,5 % das proteínas apresentaram peptídeo sinal e 20,3 % apresentaram domínios transmembrana em suas sequências. Em relação a análise de transportadores, eles foram classificados como pertencentes aos grupos de transportadores do tipo MFS (8,07%), transportadores ABC (2,08%), transportadores de glicose de alta afinidade (1,8 %), maltose permease (1,3%), oxidoredutase da família SDR (5,46%), permease de aminoácidos aromático e neutro (0,78 %), transportador de colina (1,21%) e transportador de sideróforos (0,43%).

Enzimas ativas em carboidratos (CAZymes)

Foram encontrados 508 genes que codificam CAZyme putativas: 288 glicosídeo hidrolases (GHs), 79 atividades auxiliares (AAs), 15 módulos de ligação a carboidratos (CBMs), 23 esterases de carboidratos (CEs), 75 glicosil transferases (GTs), 8 polissacarídeos liases (PLs) e 20 híbridos (GH+CBM; CBM+CE; GT+GT; AA+CBM; CE+CE) (Figura 2 e Tabela Suplementar S2).

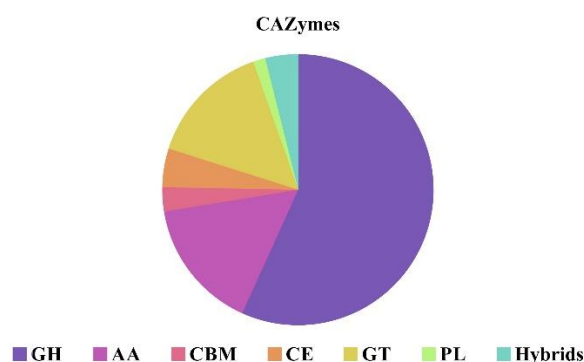


Figura 2: Distribuição de genes que codificam enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) no genoma de *Penicillium sp.* Um total de 508 genes que codificam CAZymes incluem glicosídeo hidrolases (GH), atividades auxiliares (AAs), módulos de ligação a carboidratos (CBMs), esterases de carboidratos (CEs), glicosil transferases (GTs), polissacarídeo liases (PLs) e híbridos.

A análise revelou que *Penicillium sp.* codifica um conjunto abundante de CAZymes, principalmente GHs. O genoma de *Penicillium sp.* parece codificar um grande número de enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal, tais como hemicelulose (38), celulose (89) e pectina (45). Além disso, uma ampla gama de CAZymes envolvidas na degradação da parede celular fúngica (quitinase e glucanases), outras enzimas como pectinases e amilases, e CAZymes também para o metabolismo de carboidratos livres estão presente no genoma (Tabela Suplementar S2).

Mineração genômica

Foram identificados 47 *clusters* de genes biosintéticos (BGCs) envolvidos no metabolismo secundário de *Penicillium* sp. Esses BGCs codificam 6 terpeno, 14 policetídeo sintase tipo 1 (T1PKS), 1 policetídeo sintase tipo 3 (T3PKS), 4 sintase peptídica não ribossômica (NRPS), 7 semelhantes a NRPS (*NRPS-like*), 3 semelhantes a peptídeo fúngico sintetizado ribossomalmente e modificado pós-tradução (*fungus RiPP-like*), 1 isocianato, 2 betalactona, 2 indol, 1 NI-sideróforo e 6 híbridos/outros.

A maioria dos BGCs de *Penicillium* sp. são desconhecidos. Desses BGCs, 5 apresentaram 100 % de similaridade com os clusters depositados no repositório MIBiG e estão relacionados à biossíntese dos compostos ácido clávarico, ocratoxina A, colina, subglutinol A e nidulanina A. Outros BGCs compartilham similaridade com andrastina A (80%), esqualestatina S1 (60%), gulmirecina A (57%), fenalamida (50%), afidicolina (50%), waikikiamida A (47%), lijiquinona (37%) e brasiliamida A (18%) (Tabela Suplementar S3 e Figura Suplementar S1).

O BGC de andrastina de *Penicillium* sp. foi identificado em uma região genômica de aproximadamente 57.817 pb contendo 24 genes. Parte dessa região tem similaridade com cluster de genes *adr* de *P. roqueforti* e *P. chrysogenum* (Matsuda et al., 2013; Rojas-Aedo et al., 2017), e esses clusters foram considerados para nomear cada um dos genes do *cluster de Penicillium* sp. De acordo com a nomenclatura de seus ortólogos em *P. chrysogenum* e *P. roqueforti*, genes encontrados no cluster de *Penicillium* sp. foram denominados como *adr*.

A organização dos genes do *cluster adr* de *Penicillium* sp. é *adrA*, *orf1*, *adrE*, *adrD*, *adrC*, *orf2*, *adrF*, *adrH*, *orf3*, *adrK* e *orf4*, sendo diferente da organização dos genes dos *clusters adr* de *P. roqueforti* e *P. chrysogenum* (Figura 3). Em *Penicillium* sp. ocorreu uma translocação entre os genes *adrC* e *adrE*, mudando a ordem quando comparado com as duas outras espécies de *Penicillium*. Além disso, os genes *adrC*, *adrD*, *adrE* e *adrK* apresentam sentido de transcrição diferente dos mesmos genes de *P. roqueforti* e *P. chrysogenum*.

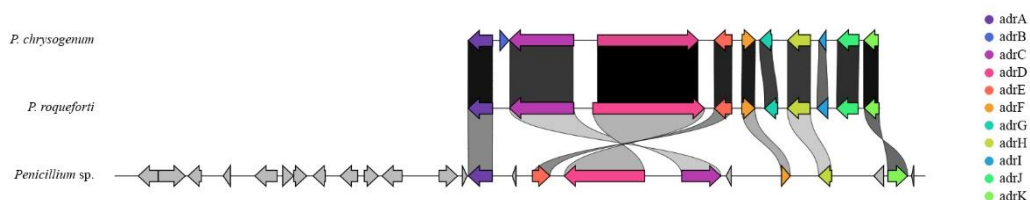


Figura 3: Organização e sintenia dos genes relacionados à biossíntese de andrastina em *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* e *Penicillium* sp. Cada gene é representado usando seta e um bloco de cor separado. O sentido das setas é referente ao sentido de transcrição do gene.

Também foi realizada uma comparação de todas as proteínas deduzidas, e estas apresentaram identidade (45-93%) com seus respectivos ortólogos de *P. roqueforti*/*P. chrysogenum* sugerindo que em *Penicillium* sp. estas proteínas devem desempenhar a mesma função atribuída as duas espécies (Tabela 2).

Tabela 2: Análise das proteínas deduzidas codificadas pelo *cluster adr* de *Penicillium* sp.

Nome do gene	Função putativa na biossíntese de andrastina	Identidade (%) com proteínas ortólogas do <i>cluster adr</i> de <i>P. chrysogenum</i> / <i>P. roqueforti</i>
<i>adrA</i>	Monooxinasase do citocromo P450	77
<i>adrB</i>	Proteína com função desconhecida	-
<i>adrC</i>	Transportador MFS	78
<i>adrD</i>	Cetorreductase	82
<i>adrE</i>	Cetorreductase	65
<i>adrF</i>	Desidrogenase de cadeia curta	67
<i>adrG</i>	Preniltransferase	-
<i>adrH</i>	Monooxigenase dependente de FAD	93
<i>adrI</i>	Terpeno cilcase	-
<i>adrJ</i>	Acetiltransferase	-
<i>adrK</i>	Metiltransferase	45

Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

O cariótipo de *Penicillium* sp. foi avaliado por PFGE. O programa A foi utilizado para separação de cromossomos pequenos e o programa B foi utilizado para separação de cromossomos grandes, e em ambos foi observada um padrão composto por quatro bandas cromossômica com tamanho estimado de 5,4 Mb (I), 4,5 Mb (II), 3,4 Mb (III) e 2,1 Mb (VI), que foram calculados com base no padrão de bandas de *S. pombe*, *S. cerevisiae* e *A. nidulans* (Figura 4). Com base nas duas condições de PFGE utilizadas, o número de bandas cromossômicas avaliadas para *Penicillium* sp. foi de quatro bandas, equivalente a quatro cromossomos.

Além disso, *Penicillium* sp. é um fungo heterotálico, onde foi possível identificar a partir da anotação do genoma.

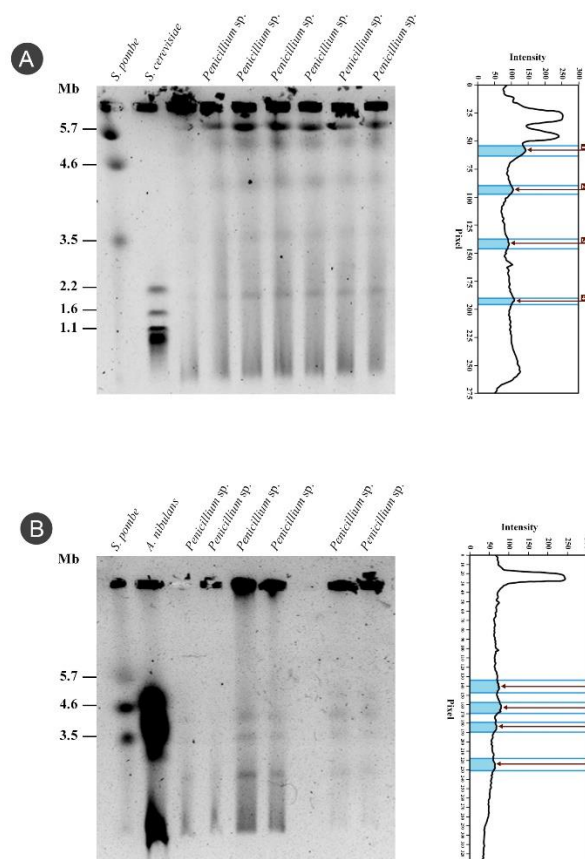


Figura 4: Cariótipo de *Penicillium* sp. revelado por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). (A) Cromossomos pequenos separados usando o programa A. Cromossomos de *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* foram usados como padrão de DNA de tamanho de cromossomo. (B) Cromossomos grandes separados usando o programa B. Cromossomos de *S. pombe* e *Aspergillus nidulans* foram usados como padrão de DNA de tamanho de cromossomo.

Identificação e anotação dos metabólitos secundários de *Penicillium* sp.

A fim de avaliar se as condições de cultivo podem induzir alterações no perfil químico de *Penicillium* sp., ele foi cultivado em BD líquido (cultura axênica) e em co-cultura em BDA com um fitopatógeno (*S. sclerotiorum*).

Os microextratos da cultura axênica tanto em partição acetato de etila (meio de cultura) quanto metanólica (micélio) foram obtidos, seguidos de análises por HPLC-HRMS e estão representados nos cromatogramas (Figura 5).

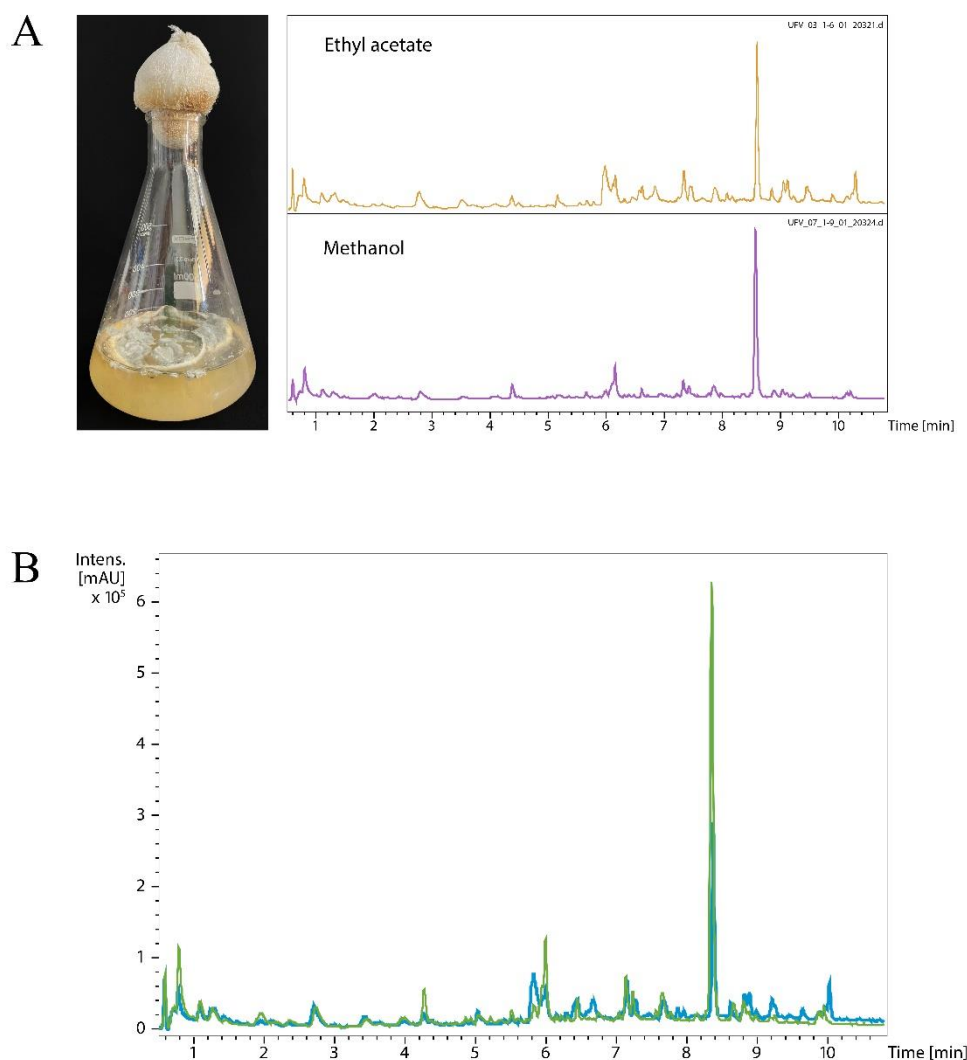
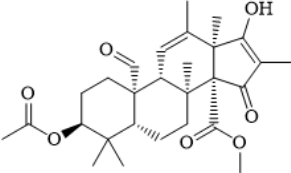
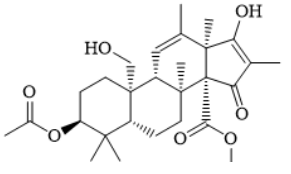
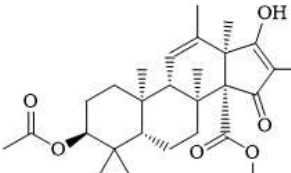
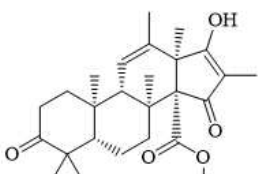


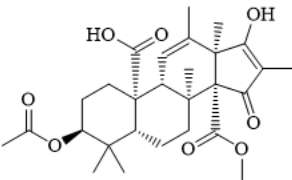
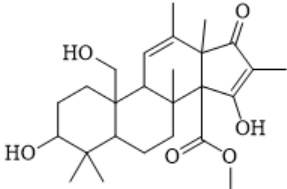
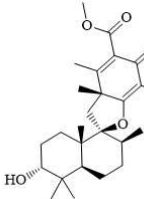
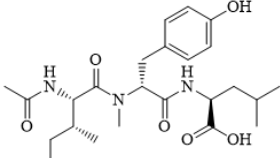
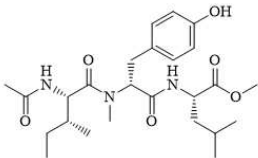
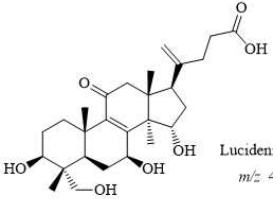
Figura 5: (A) Perfil cromatográfico DAD (190-800 nm) dos extratos de partição em acetato de etila e metanólico de *Penicillium* sp. (B) Sobreposição dos cromatogramas DAD (190-800 nm) dos extratos de partição em acetato de etila e metanólico. Os cromatogramas apresentam a complexidade e diversidade dos metabólitos produzidos pelo fungo.

Ao analisar os dois cromatogramas, fazendo uma sobreposição dos picos, é possível notar que os metabólitos majoritários produzidos por *Penicillium* sp. são os mesmos nas duas condições analisadas (Figura 5). No entanto, em alguns casos, há distinção dos metabólitos minoritários, ou seja, alguns metabólitos são detectados apenas em um dos microextratos, seja no extrato de acetato de etila ou no metanólico (micélio) (Figura 5).

Os dados MS referentes aos extratos gerados foram submetidos à plataforma GNPS com o objetivo de investigar seus perfis químicos. Essa abordagem permitiu identificar 12 e anotar 10 compostos produzidos nesse meio de cultura (Tabela 3).

Tabela 3: Metabólitos produzidos por *Penicillium* sp. em meio de cultura líquida (BD)

Composto	Estrutura	<i>m/z</i>
Andrastina A (1)		487,261
Andrastina B (2)		489,275
Andrastina C (3)		473,279
Andrastina D (4)		429,256
15-desacetilado citreoibridona E (5)		503,254

		
ácido androst-11,15-dieno-14-carboxílico, 3,15,19-triidroxi-4,4,8,12,16-pentametil-17-oxo-, éster metílico (6)		447,264
Simplicissina (7)		431,27
Simplicilliumtide D; Metabólito com N (8)		464,265
Simplicilliumtide E; Metabólito com N (9)		478,281
ácido lucidênico O (10)		477,263
Não identificado (11)	-	241,142
Não identificado (12)	-	395,216

Alguns metabólitos secundários de massa m/z 431,27; 464,265; 477,263 e 478,281 foram identificados como Simplicissin, Simplicilliumtide D, Lucidenic acid O e

Simplicilliumtide E, respectivamente pela triagem. Porém, não existe nenhum estudo que demonstre a produção desses metabólitos por fungos do gênero *Penicillium*. Além disso, dois outros metabólitos de massa m/z 241,142 e 395,216 não foram identificados pela triagem, podendo ser possivelmente novos metabólitos secundários.

Ao analisar os *clusters* na rede molecular dos metabólitos majoritários produzidos por *Penicillium* sp., um nó (íon parental em m/z 487,261) foi identificado como andrastin A. Além disso, esse mesmo *cluster*, das famílias moleculares composto por meroterpenóides, bem como seus derivados, foram identificados como: andrastin B (m/z 489,275), andrastin C (m/z 473,279), andrastin D (m/z 429,256), 15-deacetylated citreohybridone E (m/z 503,254) e androsta-11,15-diene-14-carboxylicacid,3,15,19-trihydroxy-4,4,8,12,16-pentamethyl-17-oxo-,methyl ester (m/z 447,264) (Figura 6A).

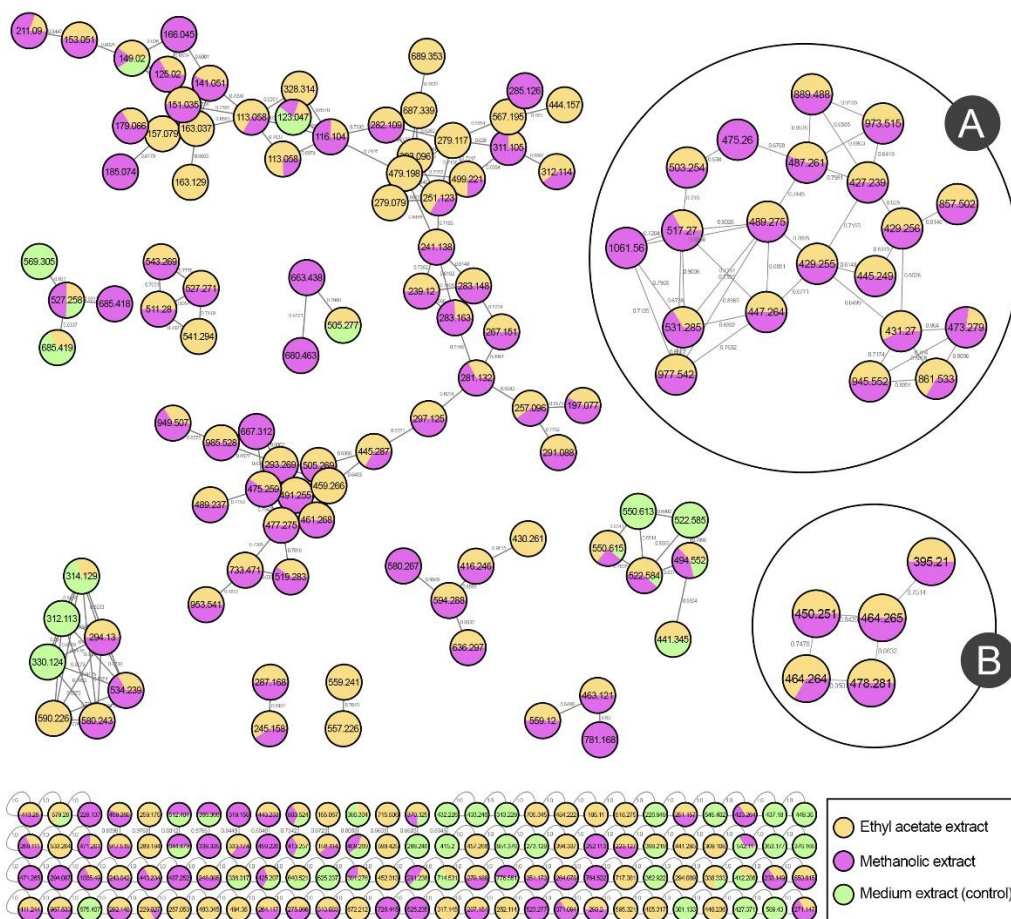


Figura 6: Rede Molecular dos metabólitos produzidos pelo fungo *Penicillium* sp. em extrato acetato de etila (meio BD - nodo de cor amarelo) e em extrato metanólico (micélio - nodo de cor roxo) e controle (nodo de cor verde). (A) e (B) Rede molecular em destaque dos metabólitos produzidos por *Penicillium* sp. que foram avaliados.

A análise de um segundo *cluster* (Figura 6B) mostrou que o fungo *Penicillium* sp. produz dois metabólitos de massa par, o que significa presença de nitrogênio em suas estruturas, m/z 464,265 e m/z 478,281, identificados pelo banco de dados espectral GNPS como Simplicilliumtide D e Simplicilliumtide E, respectivamente. Há também um outro metabólito, que é produzido de forma intensa, de massa protonada 395,216 que também se agrupa na mesma família molecular de compostos nitrogenados, o que significa que o metabólito produzido tem uma similaridade estrutural.

Os cromatogramas das diferentes regiões do meio de cultura onde foi realizada a cultura dupla estão representados na Figura 7.

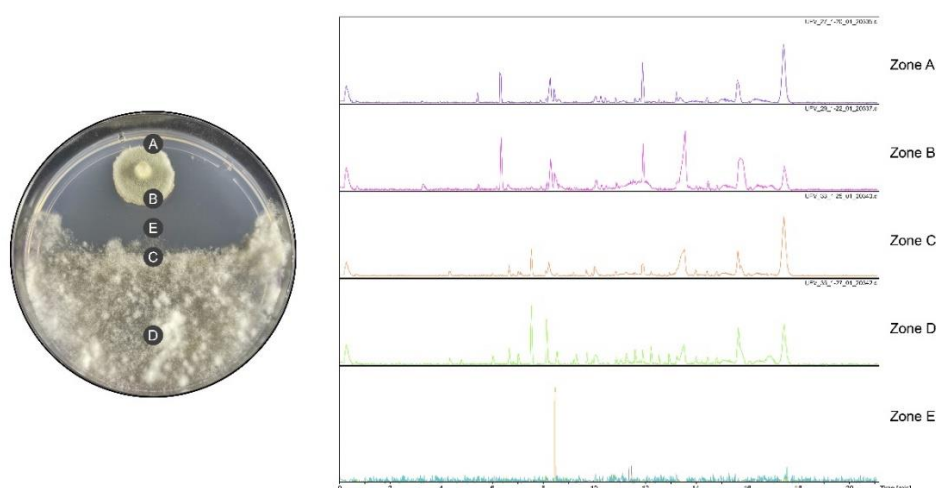


Figura 7: Perfil cromatográfico DAD (1900800 nm) dos metabólitos secundários extraídos com acetato de etila produzidos por *Penicillium* sp. na co-cultura (A e B), pelo patógeno *S. sclerotiorum* (C e D) e na interface entre *Penicillium* sp. e o patógeno (E).

Comparando os cromatogramas das diferentes regiões, o que chama a atenção nas regiões A e B é que existem quatro picos de maior destaque, relacionados a metabólitos secundários, e estes apresentaram massas de aproximadamente de 416, 478, 487 e 515 m/z . Já o cromatograma da região E (interface com o patógeno) apenas a presença de um pico de massa 478 m/z (Figura 7).

Por meio da rede molecular (Figura 8), por comparação do espectro de MS2 e perfil de fragmentação (Figura Suplementar S2), um nó foi identificado como andrastin A (487,258 m/z) e um outro nó foi identificado como sendo um análogo de andrastin A (515,291 m/z). Já os metabólitos secundários de massa 416,245 m/z , 464,265 m/z e 478,28

m/z podem ser considerados supostos peptídeos ou moléculas com a presença de nitrogênio, mas não foram possíveis de identificar. Os metabólitos secundários de massa 464, 265 m/z e 478,28 m/z foram também encontrados nos extratos de acetato de etila e no metanólico (identificados pelo banco de dados espectral GNPS como Simplicilliumtide D e Simplicilliumtide E, respectivamente) (Tabela 3 e 4

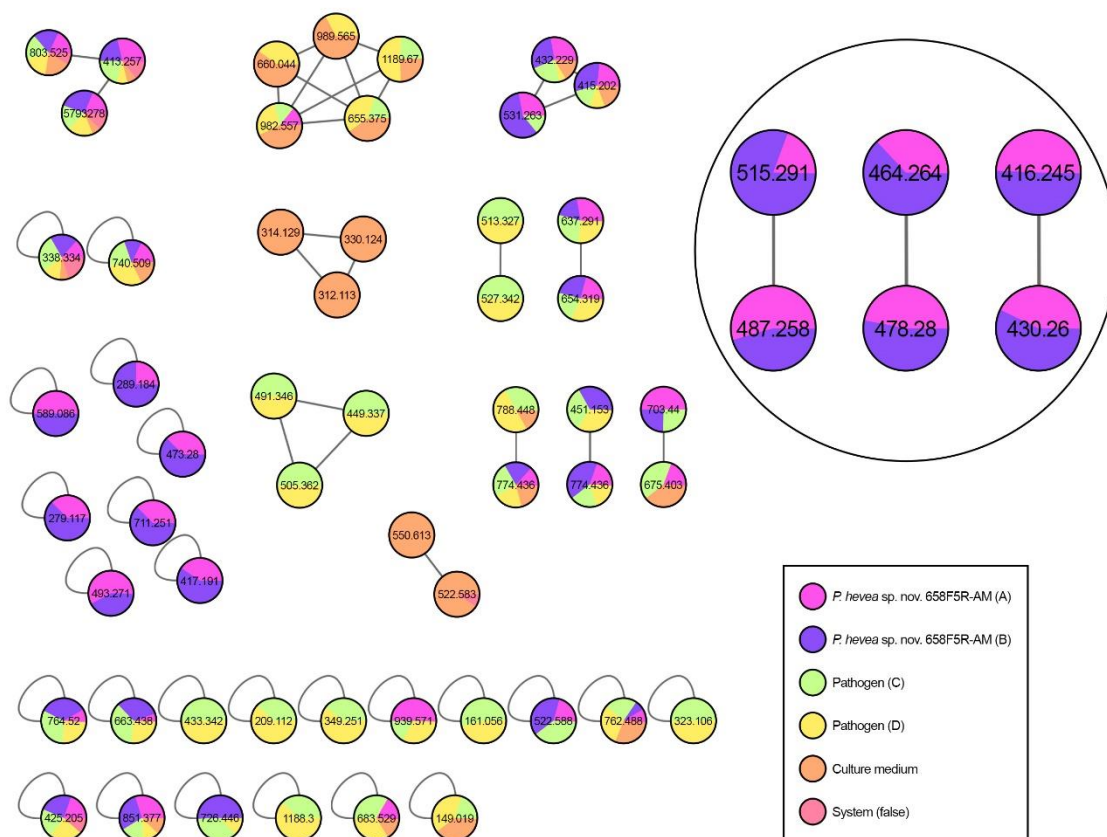
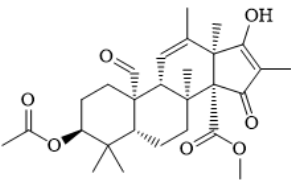
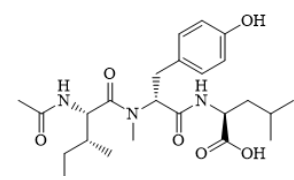
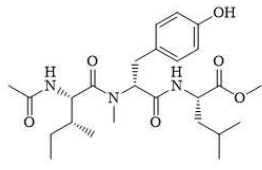


Figura 8: Rede Molecular dos metabólitos produzidos pelo fungo *Penicillium* sp. em extrato de acetato de etila (nodo de cor rosa e roxo) e metabólitos secundários produzidos pelo patógeno em acetato de etila (nodo de cor verde e amarelo). Em destaque rede molecular dos metabólitos analisados.

Tabela 4: Metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Penicillium* sp. na co-cultura (zonas A e B).

Composto	Estrutura	m/z
Andrastin A (1)		487,291
Análogo de Andrastin A (13)	-	515,291

Simplicilliumtide D; Metabólito com N (8)		464,265
Simplicilliumtide E; Metabólito com N (9)		478,281
Não identificado; Metabólito com N (14)	-	416,245

Discussão

Diferentes tecnologias de sequenciamento, seja plataformas de sequenciamento de *short reads* ou de *long reads*, afetam o número de *contigs/supercontigs/scaffolds* gerados após a montagem (Miyamoto et al., 2014). Existem estudos que relatam que plataformas de sequenciamento como Illumina HiSeq, Illumina MiSeq, Illumina GAIIx e 454-FLX Titanium, apresentaram genomas de *Penicillium* variando de 49 *supercontigs* (Berg et al., 2008) a 4775 *contigs* /102 *scaffolds* (Julca et al., 2016), enquanto montagens de plataformas de sequenciamento como PacBio e Oxford Nanopore PromethION resultaram em montagens de genomas de *Penicillium* variando de 7 (Gauthier et al., 2023) a 196 *contigs* (Fisher et al., 2022). Sendo assim, de acordo com a plataforma utilizada neste estudo para o sequenciamento do genoma de *Penicillium* sp. o número de *contigs/scaffolds* está dentro do esperado.

É apresentado neste estudo a caracterização do genoma de *Penicillium* sp., recentemente descrito como uma espécie nova do gênero *Penicillium*. De modo geral, os genomas de espécies de *Penicillium* anteriormente estudados apresentaram tamanhos variando de 25 Mb (*P. digitatum* Pd1) (Julca et al., 2016) a 36 Mb (*P. simplicissimum*) (Fisher et al., 2022) e, geralmente possuem de quatro (*P. griseoroseum*) (Teixeira et al., 2014) a oito cromossomos (*P. oxalicum*) (Pham et al., 2023), com conteúdo GC variando de 45,1 % (*P. rubens*) (Gauthier et al., 2023) a 50,61 % (*P. simplicissimum*) (Fisher et al., 2022). Esses dados vão ao encontro dos resultados obtidos neste estudo, uma vez que, o

genoma completo de *Penicillium* sp. possui um tamanho de 35 Mb e pelo resultado obtido utilizando PGFE apresenta quatro cromossomos, e um conteúdo GC de 49,14 %.

Além disso, o genoma de *Penicillium* sp. é constituído por 5,34 % de sequências repetitivas, 11.111 CDS, 179 tRNAs e 10 rRNAs, o que também está dentro dos dados já publicados para diferentes espécies de *Penicillium*. A análise BUSCO mostrou que a montagem do genoma de *Penicillium* sp. tem completude de 96,1 %, o que representa uma montagem de alta qualidade, semelhante aos dados relatados para o genoma de diferentes espécies de *Penicillium* (*P. rubens* MT45 - 96,5 %; *P. rubens* WT45- 96,5 % e *P. rubens* BM32- 96,3 %, *P. oxalicum*- 95%) (Gauthier et al., 2023; Pham et al., 2022).

A anotação funcional da sequência do genoma completo de espécies de *Penicillium* permite revelar suas habilidades abrangentes de crescer, transportar, metabolizar e responder a diferentes ambientes, bem como suas capacidades de expor compostos como enzimas e metabólitos secundários. Os fungos dependem significativamente de sua capacidade de explorar os nutrientes disponíveis em seu ambiente. Esse processo abrange desde a simples absorção de açúcares até a competição por carboidratos ou peptídeos derivados do hospedeiro. Uma estratégia utilizada pelos fungos envolve o emprego de transportadores que facilitam a eficiência de captação desses nutrientes de seu entorno (Perlin et al., 2014).

Apesar dos transportadores descritos nos resultados já serem relatados em outras espécies de *Penicillium*, o *Penicillium* sp. apresentou maior abundância em relação as permeases de aminoácidos aromáticos e neutro e transportadores MFS. Trip et al. (2004) demonstram a presença de permease de aminoácidos aromático e neutro em *P. chrysogenum*, descrevendo que são transportadores relativamente abundantes em fungos filamentosos e que provavelmente esses transportadores estejam envolvidos em funções específicas, como por exemplo na captação de moléculas sinalizadoras.

A superfamília de facilitadores principais (MFS) representa a família principal de transportadores secundários. As proteínas MFS catalisam o transporte de diversos substratos em ambas as direções através da membrana, em muitos casos catalisando o transporte ativo pela transdução da energia armazenada em um gradiente eletroquímico H⁺ e em um gradiente de concentração de substrato. Além disso, Santos et al. (2014), demonstram que os transportadores MFS podem regular indiretamente mecanismos de pH e respostas ao estresse em fungos. Os transportadores MFS são conhecidos por sua

poliespecificidade, que é parcialmente atribuída à sua estrutura hidrofóbica de ligação ao substrato, proporcionando uma adaptação a uma grande variedade de estruturas moleculares distintas (Perlin et al., 2014). De fato, é sugerido que muitos dos transportadores MFS descritos desempenham diversas funções no transporte de substratos variados. Fernández-Aguado et al. (2014) estudaram o transportador MFS denominado PenM de *P. chrysogenum* e descreveram a relação da expressão do gene *penM* com a produção e transporte de um metabólito secundário. Portanto, devido a grande versatilidade dos transportadores MFS, eles precisam ser mais explorados para determinar as suas funções em *Penicillium* sp.

As CAZymes estão intimamente relacionadas na quebra, biossíntese ou modificações de ligações glicosídicas presentes em carboidratos e glicoconjugados, e podem ser classificadas em seis classes com base na sequência e na semelhança estrutural de seus domínios funcionais (Lombard et al., 2014; Drula et al., 2022). Dentro dessas classes, as hidrolases glicosídicas (GHs) secretadas estão intimamente relacionadas ao estilo de vida e/ou no modo de aquisição de nutrientes do microrganismo. As hidrolases glicosídicas secretadas por microrganismos associados às plantas, como os fungos endofíticos, desempenham uma série de funções, por exemplo atuando como efetores para promover a colonização no hospedeiro, na aquisição de nutrientes e supressão ou prevenção da resposta imune das plantas hospedeiras (Bradley et al., 2022). A análise do banco de dados CAZy revelou que *Penicillium* sp. codifica um conjunto grande de CAZymes com ampla distribuição, semelhante aos de outros fungos *Penicillium* (Barrett et al., 2020). O genoma de *Penicillium* sp. parece codificar enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal, podendo ajudar assim o fungo a superar a barreira física, permitindo que o fungo penetre e se estabeleça no interior da planta. Uma vez dentro da planta, o *Penicillium* sp. pode usar GHs para degradar os polissacarídeos presentes nos tecidos vegetais, liberando açúcares que são usados para o seu crescimento e também para desempenhar um papel na interação fungo-planta hospedeira. Além disso, *Penicillium* sp. apresenta CAZymes envolvidas na degradação da parede celular fúngica, como glucanases e quitinase, podendo atuar no controle de fitopatógenos. Esses resultados são condizentes com o estilo de vida e modo de aquisição de nutrientes do *Penicillium* sp.

Os metabólitos secundários possuem muitas funções, podendo desempenhar papéis na interação do fungo produtor com os organismos circundantes. Eles podem ser

usados como mecanismo de defesa, como sinais de comunicação, e até mesmo para relações simbióticas (Zhgun, 2023). Além disso, devido a sua diversidade química e às suas atividades biológicas, os metabólitos secundários possuem uma diversidade de aplicações farmacológicas, alimentícias e na agricultura (Brakhage 2013). Os metabólitos secundários são categorizados em policetídeos, terpenos e peptídeos derivados de aminoácidos e também uma combinação destes, como alcalóides, meroterpenóides e híbridos de peptídeos-policetídeos (Keller, 2019; Skellam, 2022). O emprego da plataforma FungiSMASH permitiu a identificação de diferentes BGCs no genoma de *Penicillium* sp. Dentre os *clusters* de metabólitos identificados se destacam: Ácido Clavárico, Ocrotóxina A, Subglutinol A, Nidulanina A, Esqualestatina S1, Colina e Andrastin A.

O ácido clavárico que é um triterpenóide com propriedades antitumorais, sendo um inibidor da Ras-farnesil transferase humana, uma enzima crucial para a modificação pós-traducional de proteínas associadas ao câncer. Estudos recentes, como os de Byers et al. (2023) e Pham et al. (2023), identificaram BGCs que codificam a produção de ácido clavárico em quatro cepas de *Penicillium* e em *P. oxalicum*, respectivamente. Essas descobertas destacam a relevância do ácido clavárico para o desenvolvimento de terapias antitumorais, reforçando a aplicação desse metabólito.

A ocrotóxina A é uma micotoxina nefrotóxica conhecida por causar danos renais tanto em animais quanto em humanos. Essa micotoxina é produzida por algumas espécies do gênero *Penicillium*, mas poucas delas contaminam alimentos. Cabañes et al. (2010) descreveram que *P. verrucosum* e *P. nordicum* são os únicos produtores de ocrotóxina A, embora existam muitos outros relatórios sobre outras espécies de *Penicillium* produtoras, uma vez que outras podem ser identificadas de forma errada. Outras espécies de *Penicillium*, como *P. chrysogenum*, *P. glycyrrhizicola* e *P. polonicum* foram relatados como capazes de sintetizar ocrotóxina A (Chen et al., 2013). *Penicillium brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* e *P. oxalicum* também foram descritos como produtores, porém em níveis baixos (Vega et al., 2006).

No entanto, vale ressaltar que o cluster gênico da ocrotóxina A em *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *Penicillium nordicum* é composto por 5 genes que codificam proteínas-chave para a produção da micotoxina (halogenase, fator de transcrição bZIP, citocromo P450 monooxigenase, peptídeo sintase não ribossômico e policetídeos sintase) (Gil-Serna et al., 2018; Wang et al., 2018) e apenas

um único gene do cluster de *Penicillium* sp. apresentou similaridade (Figura Suplementar S2), e também nas condições testadas não foi detectada neste estudo a produção desse metabólito.

O Subglutinol A é um diterpenóide imunossupressor α -pirona que apresenta atividade osteogênica, conhecido por sua atividade antagonista no receptor de estrogênio. Quando produzido pelo fungo endofítico *Fusarium subglutinas*, subglutinol A tem demonstrado potencial terapêutico em estudos pré-clínicos (Lim et al., 2015). No entanto, até o momento, não há relatos na literatura sobre a produção desse metabólito secundário em espécies de *Penicillium*. Isso destaca a necessidade de pesquisas adicionais para explorar outras espécies fúngicas, incluindo *Penicillium* sp. para a produção de subglutinol A.

A Nidulanina A é um tetraciclopeptídeo/ isopreno isolado de *Aspergillus nidulans*, conhecido por sua estrutura complexa e potencial bioatividade. Embora sua atividade antimicrobiana ou relacionada à virulência não tenha sido amplamente testada (Raffa e Keller, 2019), a presença do cluster biossintético para nidulanina A foi identificada no genoma de *P. digitatum* (Wang et al., 2021) e *P. oxalicum* (Pham et al., 2023). de Byers et al. (2023) e Liu et al. (2024) descreveram a presença desse *cluster* em diversas cepas de *Penicillium*.

A Esqualestatina S1 é um composto altamente complexo que atua como inibidor da esqualeno sintase, uma enzima chave na biossíntese de colesterol. Oferece uma abordagem alternativa para o tratamento de hipercolesterolemia, uma vez que é capaz de atuar no controle dos níveis de colesterol (Baxter et al. 1992). Byers et al. (2023) mostraram a presença do BGCs de esqualestatina S1 em cepas de *Penicillium*, assim como Pham et al. (2023) também relataram a presença desse *cluster* no genoma de *P. oxalicum*, reforçando mais uma vez a importância da investigação da produção de metabólitos para aplicações médicas e biotecnológicas.

A colina é um metabólito essencial para o crescimento de fungos filamentosos, sendo um componente principal da fosfatidilcolina, um fosfolipídico da membrana celular (Markham et al., 1993). Park e Gander (1998) descreveram em seu trabalho que a presença de colina ajudou na adaptação do fungo *P. fellutanum* ao estresse osmótico, indicando sua importância na resposta ao ambiente. No genoma de *Penicillium* sp. foram identificados *clusters* de biossíntese e transportadores de colina e sideróforos, mostrando

que as análises feitas se complementam. Portanto, os resultados referentes a anotação funcional do genoma completo de *Penicillium* sp. são reforçados positivamente com os dados descritos na literatura, sugerindo um papel crítico desse metabólito na fisiologia e adaptação ambiental do fungo.

A andrastin A é um meroterpenóide descrito como potencial líder para medicamentos anticâncer, uma vez que inibe a atividade da farnesiltransferase das proteínas Ras oncogênicas e também promove o acúmulo intracelular de compostos anticancerígenos em células tumorais (Uchida et al., 1996ab). Já foi identificado em *P. chrysogenum* o *cluster adr* responsável pela biossíntese de andrastin A (Matsuda et al., 2013) e também em *P. roquerforti* (Rojas-Aedo et al., 2017). E no genoma de *Penicillium* sp., o BGC de Andrastin A apresentou 80% de identidade e a síntese deste metabólito foi confirmada pela análise dos extratos obtidos a partir de culturas fúngicas (Tabela 3 e 4).

Os compostos Andrastin já tiveram sua produção relatada em fungos do gênero *Penicillium*. Originalmente, Andrastin A-D foi isolada de *Penicillium* sp. FO-3929 (Omura et al., 1996; Uchida et al., 1996a; Uchida et al., 1996b; Shiomi et al., 1996), e também são produzidas por diversas outras espécies de *Penicillium* (Matsuda et al., 2013; Nielsen et al., 2005; Sonjak et al., 2005; Cheng et al., 2019). Além disso, já foi identificado em *P. chrysogenum* o *cluster adr* responsável pela biossíntese de andrastin A, na qual contém onze genes denominados *adrA*, *adrB*, *adrC*, *adrD*, *adrE*, *adrF*, *adrG*, *adrH*, *adrI*, *adrJ* e *adrK* (Matsuda et al., 2013) e também em *P. roquerforti* contendo dez genes, onde o gene *adrB* foi identificado com pseudogene residual no *cluster* (Rojas-Aedo et al., 2017). A ampla distribuição deste *cluster* em diferentes espécies de *Penicillium* remete a importância da andrastin A como alvo para desenvolvimento de novas terapias anticâncer e também para estudos para diferentes aplicações biotecnológicas.

Um metabólito secundário produzido pelo fungo *Penicillium* sp. foi identificado como Simplicissin (7) pela triagem no banco de dados espectral GNPS. Porém não existe até o momento nenhum estudo que comprove a produção desse metabólito por fungos do gênero *Penicillium*. No entanto, Zeng et al (2023) descrevem um metabólito secundário produzido por *P. sclerotiorum* E23Y-1A, pertencente ao grupo das azafilonas. Esse composto é Penicilazafilonas H, de massa 431,106 *m/z*, valor próximo *Penicillium* sp. (431,27 *m/z*), pressupondo que o composto (7) possa pertencer à mesma classe, sendo um

análogo deste composto. Além do mais, foi observado um outro metabólito secundário (**12**) que não foi identificado pela triagem. Qi et al. (2020), descreveram a produção de dois novos metabólitos terpenóides produzido pelo fungo endofítico *P. chrysogenum* MT-12, e um dos compostos, o Penicichrysogene A, possui massa espectral de 395.170 *m/z*. Esse composto possui uma massa muito próxima do metabólito secundário não identificado (395,216 *m/z*), devido a essa comparação pode ser que o composto (**12**) pertença à mesma classe, sendo um possível análogo.

Ainda relacionando os resultados obtidos com dados da literatura, o composto **13** foi identificado como sendo um análogo de Andrastin A, e Duan et al. (2016) descreveram um metabólito secundário do fungo endofítico *Penicillium* sp. T2-8 pertencente à classe dos meroterpenóides, denominado Preaustinoid D com massa de 515,261 *m/z*. Sendo assim, o composto **13** produzido pelo *Penicillium* sp. pode ser que pertença à mesma classe, sendo um análogo. Já em relação ao composto **14** que não foi identificado pela triagem, também pode ser análogo, uma vez que Ye et al. (2023) descreveram um metabólito secundário de *Penicillium* sp. como sendo Polonimida D como massa de 416,1820 *m/z* e em sua estrutura apresenta átomos de nitrogênio, semelhante ao que foi observado em *Penicillium* sp.

A descoberta de metabólitos secundários de fungos tem aumentado muito nos últimos anos, e a geração de repositórios padronizados, como por exemplo MIBiG para BGCs caracterizados e banco de dados GNPS para dados MS/MS, melhora e ajuda muito a busca e descobertas desses metabólitos. Porém, a conexão entre os dados genômicos e os dados de metaboloma não são sistematicamente documentados e são difíceis de pesquisar (Crusemann, 2021). Com isso, este trabalho fez uma conexão dos dados genômicos com os dados metabolômicos de *Penicillium* sp., e foi observada a produção e detecção do BGC de Andrastin A. No entanto, vários compostos permanecem com classificações desconhecidas e, podem possuir aplicações biotecnológicas, merecendo ser o foco de estudos futuros.

Conclusão

Este trabalho fornece uma visão mais abrangente do genoma completo de *Penicillium* sp. endofítico da seringueira, no qual foi usado uma abordagem de sequenciamento de *long reads* e diferentes ferramentas e métodos de bioinformática. Foi

apresentada a sequência do genoma completo e a anotação. E em resumo, foram identificados 14 metabólitos secundários da cultura axênica e da cultura dupla. É digno de nota o composto **1** que representa a Andrastin A, que foi identificado nos dados metabolômicos e foi identificado o *cluster* putativo responsável pela biossíntese. Além disso, o composto **1** foi o majoritariamente produzido na interface com o patógeno, que pode ser o responsável pela indução da produção deste metabólito, podendo ser investigado como potencial agente antimicrobiano contra patógenos, no entanto, a comprovação requer mais estudos sobre a sua atividade. Em relação aos demais supostos novos compostos serão necessários experimentos de engenharia genética para produzir, isolar e caracterizar, a fim de fornecer informações básicas para futuras aplicações biotecnológicas.

Referências

- Aly AH, Debbad A, Proksch P (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6): 1829-1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>.
- Araújo KS, Brito VN, Veloso TGR, Leite TS, Pereira OL, Mizubuti ESG, Queiroz MV (2018). Diversity of culturable endophytic fungi of *Hevea guianensis*: A latex producer native tree from the Brazilian Amazon. *African Journal of Microbiology Research*, 12(42):953–964. <https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8980>.
- Armenteros JJA, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4):420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.
- Ballester A-R, Marcet-Houben M, Levin E, Sela N, Selma-Lázaro C, Carmona L, Wisniewski M, Droby S, González-Candelas L, Gabaldón T (2015). Genome, Transcriptome, and Functional Analyses of *Penicillium expansum* Provide New Insights Into Secondary Metabolism and Pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3):211-373. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0261-FI>.
- Banani H, Marcet-Houben M, Ballester A-R, Abbruscato P, González-Candelas L, Gabaldón T, Spadaro D (2016). Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. *BMC Genomics* 17(19). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2347-x>.
- Barrett K, Zhao H, Hao P, Bacic A, Lange L, Holck J, Meyer AS (2022). Discovery of novel secretome CAZymes from *Penicillium sclerotigenum* by bioinformatics and explorative proteomics analyses during sweet potato pectin digestion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:950259. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.950259>.
- Baxter A, Fitzgerald BJ, Hutson JL, McCarthy AD, Motteram JM, Ross BC, Sapro M, Snowden MA, Watson NS, Williams RJ (1992). Squalestatin 1, a potente inhibitor of squalene synthase, wich lowers sérum cholesterol in vivo. *Europe PMC*, 267(17):11705-11708. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)49754-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)49754-8).
- Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran J-M, Driessen AJM, Garcia-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WHM, Joardar V, Kiel JAKW, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, Klei IJ, Peij NNM, Veenhuis M, Döhren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RAL (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology*, 26:1161–1168. <https://doi.org/10.1038/nbt.1498>.
- Bradley EL, Okmen B, Doehlemann G, Henrissat B, Bradshaw RE, Mesarich CH (2022). Secreted Glycoside Hydrolase Proteins as Effectors and Invasion of Plant-Associated Fungi and Oomycetes. *Frontiers in Plant Science*, 13:853106. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.853106>.

- Brakhage AA (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11:21-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>.
- Brakhage AA, Schroeckh V (2011). Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1):15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004>.
- Byers AK, Condrón L, O'Callaghan M, Waipara N, Black A (2023). Whole genome sequencing of *Penicillium* and *Burkholderia* strains antagonistic to the causal agent of kauri dieback disease (*Phytophthora agathidicida*) reveals biosynthetic gene clusters related to antimicrobial secondary metabolites. *Molecular Ecology Resources*, 00:1-17. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13810>.
- Cabañes FX, Bragulat MR, Castellá G (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins*, 2(5):1111-1120. <https://doi.org/10.3390/toxins2051111>.
- Cantalapiedra CP, Hernández-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J (2021). EggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38(12):5825-5829. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>.
- Carvalho AC, Lima CS, Torquato GFV, Domiciano AT, Silva SC, Abreu LM, Uemi M, Paredes-Gamero EJ, Vieira PC, Veiga TAM, Medeiros LS (2023). Chemodiversity and Anti-Leukemia Effect of Metabolites from *Penicillium setosum* CMLD 18. *Metabolites*, 13(1): 23. <https://doi.org/10.3390/metabo13010023>.
- Cheeseman K, Ropars J, Renault P, Dupont J, Gouzy J, Branca A, Abraham A-L, Ceppi M, Conseiller E, Debuchy R, Malagnac F, Silar AGP, Lacoste S, Sallet E, Bensimon A, Giraud T, Brygoo Y (2014). Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nature Communications*, 5:2876. <https://doi.org/10.1038/ncomms3876>.
- Chen AJ, Tang D, Zhou YQ, Sun BD, Li XL, Wang LZ, Gao WW (2013). Identification of Ochratoxin A producing fungi associated with fresh and dry liquorice. *Plos One*, (10):e78285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078285>.
- Cheng ZB, Xu W, Wang YY, et al (2019). Two new meroterpenoids and two new monoterpenoids from the deep sea-derived fungus *Penicillium* sp. YPGA11. *Fitoterapia*, 133:120-124. [10.1016/j.fitote.2018.12.022](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.12.022).
- Crusemann M (2021). Coupling Mass Spectral and Genomic Information to Improve Bacterial Natural Product Discovery Workflows. *Marine Drugs*, 19(3): 142. <https://doi.org/10.3390/md19030142>.
- Dennis C, Webster J (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1):25-39. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3).
- Dias ES, Queiroz MV, Cardoso PG, Barros EG, Araújo EF (1999). Transformation of *Penicillium expansum* with a heterologous gene which confers resistance to

- benomyl. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:513–514. <https://doi.org/10.1023/A:1008965113302>.
- Duan R, Zhou H, Yang Y, Li H, Dong J, Li X, Chen G, Zhao L, Ding Z (2016). Antimicrobial meroterpenoids from the endophytic fungus *Penicillium* sp. T2-8 associated with *Gastrodia elata*. *Phytochemistry Letters*, 18: 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.10.013>.
- Drula E, Garron M-L, dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50 (7): 571–577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>.
- Elias BC, Said S, de Albuquerque S, Pupo MT (2006). The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. *Microbiological Research*, 161(3):273–280. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.10.003>.
- Eldarov MA, Mardanov AV, Beletsky AV, Dzhavakhiya VV, Ravin NV, Skryabin KG (2012). Complete mitochondrial genome of compactin-producing fungus *Penicillium solitum* and comparative analysis of *Trichocomaceae* mitochondrial genomes. *FEMS Microbiology Letters*, 329(1):9–17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02497.x>.
- Fawley WN and Wilcox MH (2002). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Can Yield DNA Fingerprints of Degradation-Susceptible *Clostridium difficile* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9): 3546–3547. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3546-3547.2002>.
- Fernández-Aguado M, Martín JF, Rodríguez-Castro R, García-Estrada C, Albillos SM, Teijeira F, Ullán RV (2014). New insights into the isopenicillin N transport in *Penicillium chrysogenum*. *Metabolic Engineering*, 22:89–103. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1096717614000056>.
- Fisher S, Villers D, Plessis MD, Hattingh K, Saulse C, Basson G, Barker A, Daniel AI, Al-Hashimi A, Hitzeroth A, Makhalanyane T, Mavumengwana V, Gokul A, Keyster M, Klein A (2022). Draft Whole-Genome Sequence of *Penicillium simplicissimum* A4, a Putative Endophyte from *Echium plantagineum*. *Microbiology Resource Announcements*, 11:e0085422. <https://doi.org/10.1128/mra.00854-22>.
- Flynn JM, Hubley R, Goubert C, Smit AF (2020) RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families. *PNAS U.S.A.* 117(17):9451–9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921046117>.
- Gauthier J, Mohammadi S, Huffman J, Lawal OU, Kulkavica-Ibrulj I, Potvin M, Goodridge L, Levesque RC (2023). Complete genome sequences of agricultural azole-resistant *Penicillium rubens* encoding CYP51A and ERG11 paralogues. *Microbiology Resource Announcements*, 12:e00188–23. <https://doi.org/10.1128/MRA.00188-23>.
- Gil-Serna J, García-Díaz M, González-Jaén MT, Vázquez C, Patiño B (2018). Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. *Internacional Journal*

- of Food Microbiology, 268(2):35-43.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.028>.
- Gouda S, Das G, Sen SK, et al (2016). Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers in Microbiology*, 7:1538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>.
- Grijseels S, Nielsen JC, Randelovic M, Nielsen J, Nielsen KF, Work man M, Frisvad JC (2016). *Penicillium arizonense*, a new, genome sequenced fungal species, reveals a high chemical diversity in secreted metabolites. *Scientific Reports*, 6:35112. <https://doi.org/10.1038/srep35112>.
- Hassan SED (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 8(6):687-695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>.
- Julca I, Droby S, Sela N, Marcet-Houben M, Gabaldón T (2016). Contrasting Genomic Diversity in Two Closely Related Postharvest Pathogens: *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. *Genome Biology and Evolution*, 8(1):218–227. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv252>.
- Kanashiro AM, Akiyama DY, Kupper KC, Fill TP (2020). *Penicillium italicum*: An Underexplored Postharvest Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 11:606852. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.606852>.
- Kaur R, Saxena S (2023). *Penicillium citrinum*, a Drought-Tolerant Endophytic Fungus Isolated from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves with Plant Growth-Promoting Abilities. *Current Microbiology*, 80:154. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03283-3>.
- Keller NP (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug Discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17:167-180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>.
- Kjærboelling I, Mortensen UH, Vesth T, Andersen MR (2019). Strategies to establish the link between biosynthetic gene clusters and secondary metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 130:107–121. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.06.001>.
- Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs, *Nature Biotechnology*, 37:540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3):567-580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.
- Lee YE, Lee HJ, Kim CH, Ryu S, Kim Y, Jo C (2022). Effect of *Penicillium candidum* and *Penicillium nalgioense* and their combination on the physicochemical and sensory quality of dry-aged beef. *Food Microbiology*, 107: 104083. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104083>.

- Li B, Zong Y, Du Z, Chen Y, Zhang Z, Qin G, Zhao W, Tian S (2015). Genomic Characterization Reveals Insights Into Patulin Biosynthesis and Pathogenicity in *Penicillium* Species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6):635-735. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0398-FI>.
- Lichtner FJ, Jurick II WM, Bradshaw M, Broeckling C, Bauchan G, Brothers K (2022). *Penicillium raperi*, a species isolated from Colorado cropping soils, is a potential biological control agent that produces multiple metabolites and is antagonistic against postharvest phytopathogens. *Mycological Progress*, 21(62):01812-1. <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01812-1>.
- Lim W, Park J, Lee YH, Hong J, Lee Y (2015). Subglutinol A, an immunosuppressive α -pyrone diterpenoid from *Fusarium subglutinans*, acts as an estrogen receptor antagonist. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(3):507-512. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.053>.
- Link HF (1809). *Observationes in ordines plantarum naturales: Pofessore Rostochiensis*.
- Liu X, Wang X, Zhou F, Xue Y, Liu C (2024). Genomic insights into *Penicillium chrysogenum* adaptation to subseafloor sedimentar environments. *BMC Genomics*, 25(4):09921-1. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09921-1>.
- Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42 (1): 490-495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- Luciano-Rosario D, Keller NP, Jurick II WM (2020) *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Molecular Plant Pathology*, 21(11):1389-1526. <https://doi.org/10.1111/mpp.12990>.
- Marcet-Houben M, Ballester A-R, de la Fuente B, Harries E, Marcos JF, González-Candelas L, Gabaldón T (2012). Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics* 13: 646. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-646>.
- Markham P, Robson GD, Bainbridge BW, Trinci APJ (1993). Choline: Its role in the growth of filamentous fungi and the regulation of mycelial morphology. *FEMS Microbiology Reviews*, 10(3-4):287-300. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05872.x>.
- Matsuda Y, Awakawa T, Abe I (2013). Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A. *Tetrahedron*, 69(38):8199-8204. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.029>.
- Miyamoto M, Motooka D, Gotoh K, Imai T, Yoshitake K, Goto N, Iida T, Yasunaga T, Horii T, Arakawa K, Kasahara M, Nakamura S (2014). Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes. *BMC Genomics*, 15:699. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-699>.
- Nielsen KF, Dalsgaard PW, Smedsgaar J, et al (2005). Andrastins A–D, *Penicillium roqueforti* Metabolites Consistently Produced in Blue-Mold-Ripened Cheese.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(8):2908-2913. <https://doi.org/10.1021/jf047983u>.
- Omura S, Inokoshi J, Uchida R, et al (1996). Andrastins A-C, New Protein Farnesyltransferase Inhibitors Produced by *Penicillium* sp. FO-3929. The Journal of Antibiotics. 49(5):414-417. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.414>
- Palmer J, Stajich J (2019). nextgenusfs/funannotate: funannotate v1.5.3. Version 1.5.3. Zenodo. URL <https://zenodo.org/record/2604804>.
- Park Y-II, Gander J (1998). Choline Derivatives Involved in Osmotolerance of *Penicillium fellutanum*. Applied and Environmental Microbiology, 64(1):273-278. <https://doi.org/10.1128/aem.64.1.273-278.1998>.
- Peng M, Dilokpimol A, Makela MR, Hildén K, Bervoets S, Riley R, Griogoriev IV, Hainaut M, Henrissat B, Vries RP, Granchi Z (2017). The draft sequence of the ascomycete fungus *Penicillium subrubescens* reveals a highly enriched content of plant biomass related CAZymes compared to related fungi. Journal of Biotechnology, 246:1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.012>.
- Petrini O (1991). Fungal Endophytes of Tree Leavez. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds) Microbial Ecology of Leaves. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9.
- Perlin MH, Andrews J, Toh SS (2014). Chapter Four- Essential Letters in the Fungal Alphabet: ABC and MFS Transporters and Their Roles in Survival and Pathogenicity. Advances in Genetics, 85:201-253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800271-1.00004-4>.
- Pham HM, Le DT, Le LT, Chu PTM, Tran LH, Pham TT, Nguyen HM, Luu TT, Hoang H, Chu HH (2023). A highly quality genome sequence of *Penicillium oxalicum* species isolated from the root of *Ixora chinensis* in Vietnam. G3 (Bethesda), 13(2). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac300>.
- Qi B, Jia F, Luo Y, Ding N, Li S, Shi F, Hai Y, Wang L, Zhu Z-X, Liu X, Tu P, Shi S-P (2020). Two new diterpenoids from *Panicillium chrysogenum* MT-12, a endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*. Natural Product Research, 36(3):814-821. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1808637>.
- Qin Y-Y, Huang X-S, Liu X-B, Mo T-X, Xu Z-L, Li B-C, Qin X-Y, Li J, Schaberle TF, Yang R-Y (2020). Three new andrastin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium vulpinum*. Natural Product Research, 36(13):3262-3270. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1853725>.
- Queiroz MV, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2000). Electrophoretic characterization of *Aspergillus nidulans* strains with chromosomal duplications. Genetics and Molecular Biology, 23 (2): 293-297. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000200009>.
- Ramón-Carbonell M, Sánchez-Torres P (2021). *Penicillium digitatum* MFS transportes can display diferente roles during pathogen-fruit interaction. International Journal

of Food Microbiology, 337:108918.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108918>.

- Raffa N, Keller NP (2019). A call to arms: Mustering secondary metabolites for success and survival of an opportunistic pathogen. *Plos Pathogens*, 15(4):e1007606. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007606>.
- Saier MH, Tran CV, Barabote RD (2006). TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Research*, 1(34):181-186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj001>.
- Sambrook, J and Russell, DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos SC, Teixeira MC, Dias PJ, Sá-Correia I (2014). MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: understanding their physiological function through post-genomic approaches. *Frontiers in Physiology*, 5:180. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00180>.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31:3210-3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>.
- Skellam E (2022). Subcellular localization of fungal specialized metabolites. *Fungal Biology and Biotechnology*, 9(11). <https://doi.org/10.1186/s40694-022-00140-z>.
- Specht CA, DiRusso CC, Novotny CP, Ullrich RC (1982). A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, 119(1):158–163. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90680-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90680-7).
- Sreeja-Raju A, Christopher M, Kooloth-Valappil P, Kuni-Parambil R, Gokhale DV, Sankar M, Abraham A, Pandey A, Sukumaran (2020). *Penicillium janthinellum* NCIM1366 shows improved biomass hydrolysis and a larger number of CAZymes with higher induction levels over *Trichoderma reesei* RUT-C30. *Biotechnology for Biofuels*, 13:196. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01830-9>.
- Shiomi K, Uchida R, Inokoshi J, et al (1996). Andrastins A-C, New Protein Farnesyltransferase Inhibitors Produced by *Penicillium* sp. FO-3929. *Tetrahedron Letters*. 37(8):1265-1268. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)02412-3](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)02412-3)
- Sofian FF, Kurniawati N, Yoshida J, Ito Y, Tchoukoua A, Tabopda TK, Lannang AM, Ngadjui BT, Koseki T, Shiono Y (2023). New fatty acid ester and meroterpenoid produced by the endophytic fungus *Penicillium* sp. NR-1. *Phytochemistry Letters*, 56:5-12. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.05.013>.
- Sonjak S, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N (2005). Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS Microbiology Ecology*. 53(1):51-60. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.014>.

- Suraby EJ, Agisha VN, Dhandapani S, Sng YH, Lim SH, Naqvi NI, Sarojam R, Yin Z, Park BS. Plant growth promotion under phosphate deficiency and improved phosphate acquisition by new fungal strain, *Penicillium olsonii* TLL1. *Front Microbiol.* 2023 Oct 19;14:1285574. doi: 10.3389/fmicb.2023.1285574.
- Tang JW, Kong LM, Zu WY, et al (2019). Isopenicins A–C: Two Types of Antitumor Meroterpenoids from the Plant Endophytic Fungus *Penicillium* sp. sh18. *Organic Letters.* 21(3):771-775. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b04020>
- Tarailo-Graovac M, Chen N (2009). Using RepeatMaskeer to identify repetitive elements in genomic sequences. *Current Protocols in Bioinformatics*, 4(4):1-4. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0410s25>.
- Tarroum M, Romdhane WB, Al-Qurainy F, Ali AAM, Al-Doss A, Fki L, Hassairi A (2022). A novel PGPF *Penicillium olsonii* isolated from the rhizosphere of *Aeluropus littoralis* promotes plant growth, enhances salt stress tolerance, and reduces chemical fertilizers inputs in hydroponic system. *Frontiers in Microbiology*, 13:996054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.996054>.
- Teixeira JA, Nogueira GB, Queiroz MV, Araújo EF (2014). Genome organization and assessment of high copy number and increased expression of pectinolytic genes from *Penicillium griseoroseum*: a potential heterologous system for protein production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 1571–1580. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1486-4>.
- Toghueo RMK, Boyom FF (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 10(3):107. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>.
- Torngvist EGM, Peterson WH (1956). Penicillin Production by High-yielding Strains of *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology*, 4(5):277-283. <https://doi.org/10.1128/am.4.5.277-283.1956>.
- Torres-Garcia D, Gene J, Garcia D (2022). New and interesting species of *Penicillium* (Eurotiomycetes, Aspergillaceae) in freshwater sediments from Spain. *MycKeys*, 86:103–145. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.86.73861>.
- Trip H, Evers ME, Driessen AJM (2004). PcMtr, na aromatic and neutral aliphatic amino acid permease of *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1667(2):167-173. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.014>.
- Uchida R, Shiomi K, Inokoshi J, et al (1996a). Andrastins A-C, New Protein Farnesyltransferase Inhibitors Produced by *Penicillium* sp. FO-3929. *The Journal of Antibiotics*, 49(5):418-424. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.418>
- Uchida R, Shiomi K, Inokoshi J, et al (1996b). Andrastin D, Novel Protein Farnesyltransferase Inhibitor Produced by *Penicillium* sp. FO-3929. *The Journal of Antibiotics*, 49(12):1278-1280. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.1278>
- Utami ST, Indriani CI, Bowolaksono A, Yaguchi T, Chen X, Niimi K, Niimi M, Kajiwara S (2020). Identification and functional characterization of *Penicillium marneffeii*

major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 84(7):1373-1383. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1732185>.

- Rojas-Aedo JF, Gil-Durán C, Del-Cid A, Valdés N, Álamos P, Vaca I, García-RICO r, Levicán G, Tello M, Chávez R (2017). The Biosynthetic Gene Cluster for Andrastin A in *Penicillium riqueforti*. *Frontiers in Microbiology*, 8:813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00813>.
- Vega FE, Posada F, Peterson SW, Gianfagna TJ, Chaves F (2006). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 96. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832710>.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1):343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- Ye R, Biango-Daniels M, Steenwyk JL, Rokas A, Louw NL, Nardella R, Wolfe BE (2024). Genomic, transcriptomic, and ecological diversity of *Penicillium* species in cheese rind microbiomes. *Fungal Genetics and Biology*, 171:103862. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103862>.
- Ye Y, Liang J, Ela J, et al (2023). Two New Alkaloids and a New Butenolide Derivative from the Beibu Gulf Sponge-Derived Fungus *Penicillium* sp. SCSIO 41413. *Marine Drugs*. 21(1): 27. <https://doi.org/10.3390/md21010027>.
- Yin G, Zhao H, Pennerman KK, Jurick II WM, Fu M, Bu L, Guo A, Bennett J (2021). Genomic Analyses of *Penicillium* Species Have Revealed Patulin and Citrinin Gene Clusters and Novel Loci Involved in Oxylinin Production. *Journal of Fungi*, 7(9):743. <https://doi.org/10.3390/jof7090743>.
- Yu J, Jurick II WM, Cao H, Yin Y, Gaskins VL, Losada L, Zafar N, Kim M, Bennett JW, Nierman WC (2014). Draft Genome Sequence of *Penicillium expansum* Strain R19, Which Causes Postharvest Decay of Apple Fruit. *Genome Announcements*, 2(3):e00635-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00635-14>.
- Yuan H, Shi B, Huang T, Zhou Z, Wang L, Hou H, Tu H (2021). Biological Control of Pear *Valsa Canker* Caused by *Valsa pyri* Using *Penicillium citrinum*. *Horticulturae*, 7(7):198. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7070198>.
- Waqas M, Khan AL, Hamayun M, Shahzad R, Kang S-M, Lee I-J (2015). Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *Journal of Plant Interactions*, 10(1): 280-287. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1079743>.
- Wang M, Ruan R, Li H (2021). The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Penicillium digitatum*. *Genomics*, 113(2):439- 446. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.001>.
- Wang Y, Wang L, Wu F, Liu F, Wang Q, Zhang X, Selvaraj JN, Zhao Y, Xing F, Yin W-B, Liu Y (2018). A Consensus Ochratoxin A Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of *Aspergillus ochraceus* and a Comparative Genomic

Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19):e01009-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01009-18>.

Woo PCY, Lau SKP, Liu B, Cai JJ, Chong KTK, Tse H, Kao RYT, Chan C-M, Chow W-N, Yuen K-Y (2011). Draft Genome Sequence of *Penicillium marneffeii* Strain PM1. *ASM Journals*, 10(12):1740-1. <https://doi.org/10.1128/ec.05255-11>.

Zhang J, Yuan B, Liu D, Gao S, Proksch P, Lin WH (2018). Brasilianoids A-F, New Meroterpenoids From the Sponge-Associated Fungus *Penicillium brasilianum*. *Frontiers in Chemistry*, 6:314. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00314>.

Zang Y, Gong Y, Chen X, Wen H, Qi C, Chen C, Liu J, Luo Z, Wang J, Zhu H, Zhang Y (2021). Piperazine-2,5-dione derivatives and an α -pyrone polyketide from *Penicillium griseofulvum* and their immunosuppression activity. *Phytochemistry*, 186:112708. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112708>.

Zeng Y, Wang Z, Chang W, Zhao W, Wang H, Chen H, Dai H, Fang LV (2023). New azaphilones from the Marine-Derived Fungus *Penicillium sclerotiorum* E23Y-1^a with their Anti-Inflammatory and Antitumor Activities. *Marine Drugs*, 21(2):75. <https://doi.org/10.3390/md21020075>.

Zhang X, Hindra, Elliot MA (2019). Unlocking the trove of metabolic treasures: activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria and fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 51:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.03.003>.

Zhao X, Liu X, Zhao H, Ni Y, Lian O, Qian H, He B, Liu H, Ma Q (2021). Biological control of Fusarium wilt of sesame by *Penicillium bilaiae* 47M-1. *Biological Control*, 158:104601. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104601>.

Zheng J, Ge Q, Yan Y, Zhang X, Huang L, Yin Y (2023). dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Research*, 51(5):115-121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad328>.

Zhgun AA (2023). Fungal BGCs for Production of Secondary Metabolites: Main Types, Central Roles in Strain Improvement, and Regulation According to the Piano Principle. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13):11184. <https://doi.org/10.3390/ijms241311184>.

Material Suplementar

Tabela Suplementar S1: Resumo da principal anotação funcional da via KEGG de genes previstos usando GhostKOALA.

Functional category	<i>Penicillium sp.</i> 658F5R-AM
Annotated	4446 entries (40,0%) annotated
Metabolism	
(1) Carbohydrate metabolismo	309
(2) Energy metabolismo	142
(3) Lipid metabolismo	147
(4) Nucleotide metabolismo	73
(5) Amino acid metabolismo	283
(6) Metabolism of other amino acids	61
(7) Glycan biosynthesis and metabolismo	97
(8) Metabolism of cofactors and vitamins	140
(9) Metabolism of terpenoids ad polyketides	32
(10) Biosynthesis of other secondary metabolites	51
(11) Xenobiotics biodegradation and metabolismo	82
Genetic Information Processing	
(12) Transcription	141
(13) Translation	301
(14) Folding, sorting and degradation	253
(15) Replication and repair	23
Environmental Information Processing	
(16) Membrane transport	
(a) ABC transportes	7
(b) Bacterial secretion system	2
(17) Signal transduction	
(a) Two-component system	18
(b) Other	429
Cellular Processes	
(18) Transport and catabolism	379

(19) Cell growth and death	310
(20) Cellular community	
(a) Focal adhesion	12
(b) Adherens junction	9
(c) Tight junction	21
(d) Gap junction	8
(e) Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	5
(21) Cell motility	55

Tabela Suplementar S2: Supostas enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) em *Penicillium* sp.

	Cazy Family (number)
	GH1 (5)
	GH3 (20)
	GH5 (1)
	GH5_4 (1)
	GH5_5 (4)
	GH5_7 (3)
	GH7 (3)
	GH30_7 (1)
	GH45_2 (1)
Cellulose	AA3 (2)
	AA7 (19)
	AA8 (2)
	AA9 (5)
	AA16 (1)
	GT2 (15)
	CBM1 (3)
	CBM46 (1)
	CBM63 (1)
	CE1 (1)
Hemicellulase	CE4 (5)
	CE5 (4)
	CE12 (2)

	GH5_15 (2)
	GH10 (1)
	GH11 (2)
	GH27 (2)
	GH29 (2)
	GH30_5 (1)
	GH31 (1)
	GH35 (3)
	GH43 (1)
	GH43_1 (1)
	GH62 (1)
	GH93 (4)
	GH95 (3)
	GH106 (2)
	GH5_9 (2)
	GH5_23 (1)
	GH5_24 (1)
	GH7 (1)
	GH12 (2)
	GH16_18 (4)
Glucans/ Glucanases	GH17 (3)
	GH30_3 (2)
	GH55 (1)
	GH55_2 (4)
	GH128 (3)
	GH132 (2)
	GT48 (2)
	GH28 (8)
	GH53 (1)
	GH78 (11)
Pectin/Pectinases	GH88 (2)
	GH105 (3)
	CE8 (5)

	CE12 (2)
	PL1_4 (3)
	PL1_7 (1)
	PL4_3 (1)
	PL4_5 (1)
	GH18 (11)
Chitin/Chitinases	GH20 (1)
	AA11 (1)
	GH13_1 (1)
Amylases	GH13_5 (1)
	GH13_8 (1)
	GH13_22 (3)
	GH2 (6)
	GH5_12 (1)
	GH5_16 (1)
	GH5_22 (2)
	GH5_23 (3)
	GH5_27 (1)
	GH5_31 (2)
	GH13 (1)
	GH13_40 (5)
	GH13_25 (1)
Others/ Free Carbohydrates	GH15 (4)
	GH16 (1)
	GH16_1 (6)
	GH16_2 (1)
	GH16_3 (1)
	GH16_19 (1)
	GH16_22 (1)
	GH25 (2)
	GH30_7 (1)
	GH31_1 (3)
	GH31_2 (1)

GH31_3 (1)
GH31_4 (2)
GH31_13 (1)
GH31_15 (1)
GH32 (3)
GH33 (2)
GH36 (4)
GH37 (1)
GH38 (3)
GH43_6 (4)
GH43_13 (1)
GH43_14 (2)
GH43_24 (2)
GH43_26 (1)
GH43_30 (3)
GH43_36 (1)
GH47 (7)
GH51_1 (2)
GH51_2 (1)
GH55 (1)
GH64 (1)
GH65 (1)
GH67 (2)
GH71 (3)
GH72 (5)
GH76 (7)
GH78 (1)
GH79 (3)
GH81 (1)
GH84 (1)
GH89 (2)
GH92 (6)
GH114 (1)

GH125 (1)
GH127 (1)
GH130_3 (3)
GH134 (1)
GH135 (2)
GH136 (1)
GH144 (1)
GH154 (3)
GH177 (4)
GH184 (1)
GT1 (2)
GT3 (1)
GT4 (6)
GT8 (4)
GT15 (3)
GT17 (1)
GT20 (4)
GT21 (1)
GT22 (2)
GT24 (1)
GT32 (3)
GT33 (1)
GT34 (4)
GT35 (1)
GT39 (3)
GT50 (1)
GT57 (2)
GT58 (2)
GT59 (1)
GT62 (3)
GT66 (1)
GT69 (3)
GT71 (4)

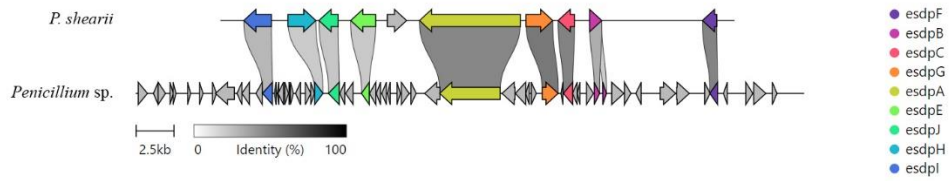
	GT76 (1)
	GT90 (4)
	CBM20 (3)
	CBM21 (1)
	CBM67 (2)
	CBM91 (1)
	CBM96 (1)
	AA1 (5)
	AA1_2 (4)
	AA1_3 (4)
	AA2 (3)
	AA3_1 (2)
	AA3_2 (20)
	AA4 (6)
	AA5_2 (1)
	AA6 (1)
	CE3 (2)
	CE9 (2)
	CE16 (1)
	PL35 (1)
	GH7+CBM1 (1)
	GH13_22+GH13_22 (1)
	GH15+CBM20 (1)
	GH43+CBM91 (4)
	GH43_14+CBM91 (2)
	GH72+CBM43 (1)
Hybrids	CBM7+GH78 (1)
	CBM67+GH78 (5)
	CBM87+CE18 (1)
	GT2+GT2 (1)
	AA13+CBM20 (1)
	CE8+CE8 (1)

Tabela Suplementar S3: Clusters gênicos identificados no genoma de *Penicillium* sp. pelo antiSMASH.

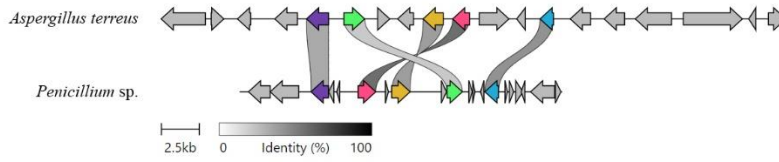
Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
1.1	Terpene	126459	151106	-	-
1.2	NRPS-like	158058	201359	-	-
1.3	T1PKS	468868	517138	-	-
1.4	T1PKS	793022	837005	Subglutanol	100 %
1.5	NI-siderophore	1257977	1286597	-	-
1.6	NRPS-like	1945328	1989974	-	-
1.7	Índole	3867953	3889170	Butyrolactone III	26 %
1.8	T1PKS	5093594	5139664	Aurofusarin	18 %
1.9	Terpene	5307489	5330244	Clavarinic acid	100 %
1.10	T1PKS	6011300	6056738	Ochratoxin A	100 %
2.1	NRPS	356771	402956	Metachelin C	25 %
2.2	T1PKS	487457	535572	-	-
2.3	T1PKS	2151161	2201189	-	-
2.4	NRP-metallophore; NRPS	2598866	2658972	-	-
2.5	NRPS, NRPS-like	2603313	2654155	-	-
2.6	T1PKS; NRPS-like	2946088	3003621	Phenalamide	50 %
2.7	T1PKS; NRPS-like	3826212	3878522	-	-
3.1	Isocyanide	787321	829161	-	-
3.2	NRPS-like	844622	887771	Brasiliamide I	16 %
3.3	Betalactonase	1572945	1601621	-	-
3.4	NRPS-like	2130280	2173636	-	-
3.5	T1PKS	2770530	2812566	Ajudazol A	38 %
3.6	T1PKS	2766612	2813531	-	-
3.7	NRPS	2967068	3015636	-	-
3.8	T1PKS	3572508	3622051	-	-

3.9	T1PKS	3677271	3724280	Waikikiamide A	45 %
4.1	Fungal-RiPP-like	997643	1057852	-	-
4.2	NRPS	1965281	2023358	Nidulanin A	100 %
4.3	Terpene	2144263	2167348	Aphidicolin	50 %
4.4	NRPS-like	2680310	2724196	Choline	100 %
5.1	Other; T1PKS	111284	199426	Lijiquinone	37 %
5.2	T1PKS	142431	200142	Lijiquinone	25 %
5.3	NRPS	1992685	2040650	-	-
6.1	Betalactone	505196	529576	-	-
7.1	Fungal-RiPP-like	151778	1212023	-	-
7.2	T1PKS	468219	516176	-	-
7.3	T3PKS	1962495	2003578	-	-
7.4	Terpene	2506494	2527000	Astellloide A	20%
8.1	T1PKS	297944	345365	-	-
8.2	NRPS-like	1019759	1063336	-	-
8.3	Índole	1724696	1745799	-	-
8.4	Fungal-RiPP-like	2042379	2102822	-	-
8.5	T1PKS	2467705	2515621	-	-
8.6	T1PKS; terpene	2812277	2870093	Andrastin A	80 %
8.7	Terpene	2848704	2869756	Squalestatin S1	60 %
9.1	NRPS-like	773297	817430	-	-
11.1	Terpene	526860	548002	-	-

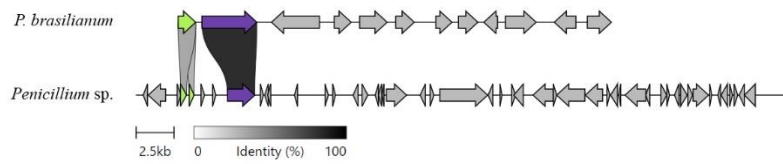
Subglutinol



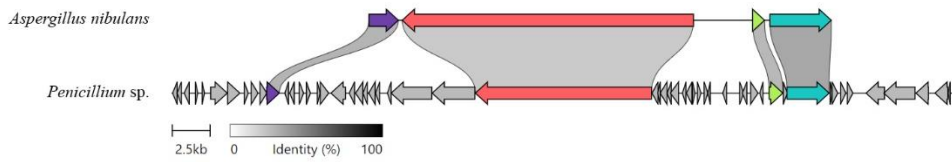
Butirolactona



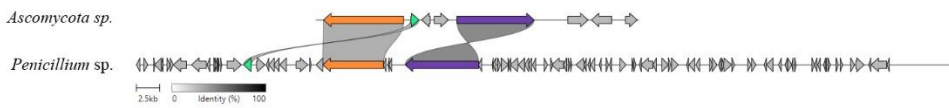
Brasiliamide I



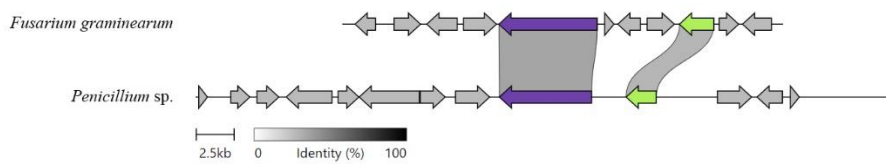
Nidulanin A



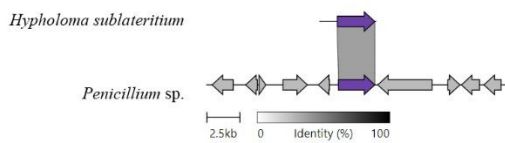
Lijiquinone



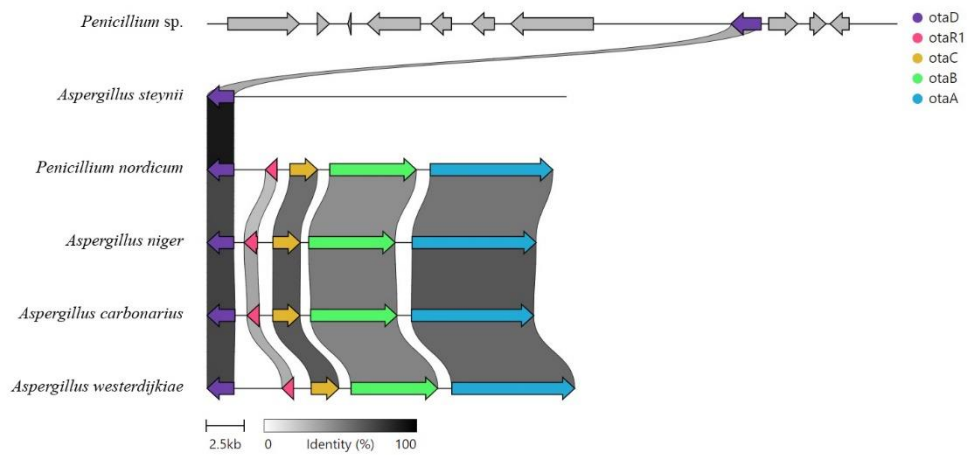
Surofusarin



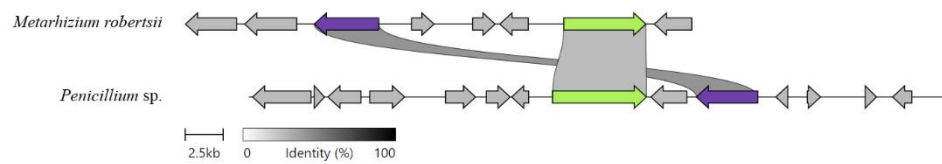
Claravic acid



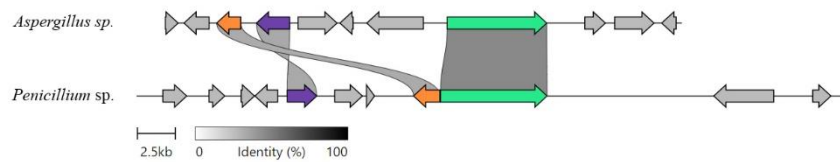
Ochratoxin A



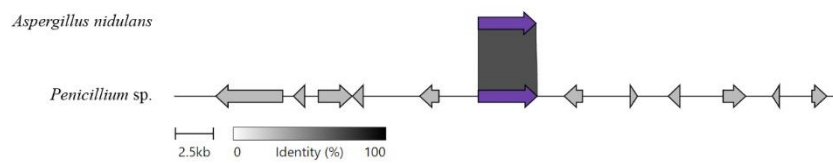
Metachelin C



Waikikiamide



Choline



Lijiquinone

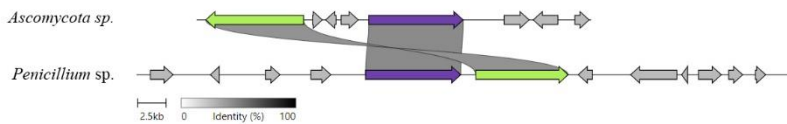
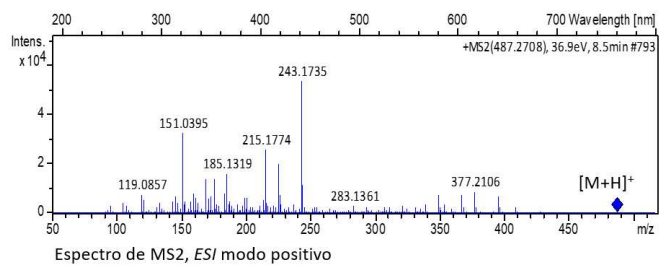
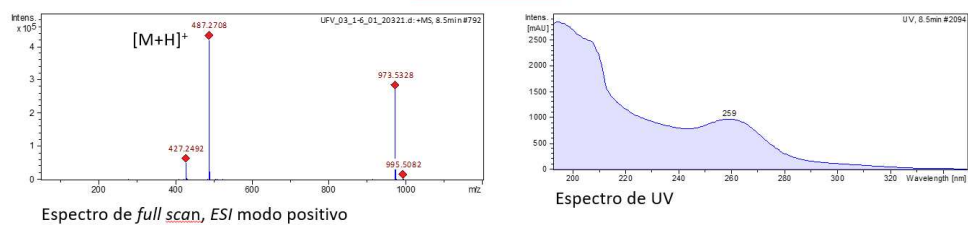


Figura Suplementar S1: Sintenia dos BGCs identificados no genoma de *Penicillium sp.*

Andrastin A



34

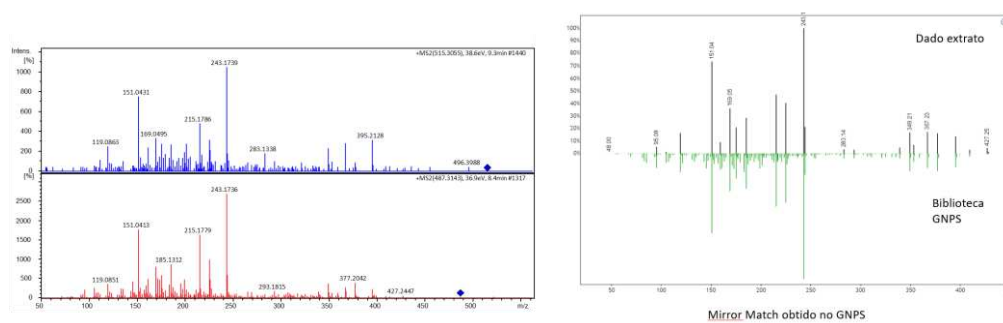


Figura Suplementar S2: Comparação do espectro de MS2 da Andrastin A e seu análogo, em que é verificado o mesmo perfil de fragmentação.

Capítulo 3: Comparative analysis and complete sequence of the mitochondrial genome of *Penicillium* sp. endophytic fungus of *Hevea brasiliensis* (rubber tree).

ABSTRACT

We report for the first time the complete mitochondrial genome sequence of *Penicillium* sp. endophytic fungus of *Hevea brasiliensis* (rubber tree). The mitochondrial genome of *Penicillium* sp. is a circular-mapping DNA molecule containing 27.999 base pairs. It encodes a characteristic set of mitochondrial proteins such as ATP synthase subunits 6, 8, and 9 (*atp6*, *atp8*, and *atp9*), cytochrome oxidase subunits I, II, and III (*cox1*, *cox2*, and *cox3*), apocytochrome (*cob*), reduced nicotinamide adenine dinucleotide ubiquinone oxidoreductase subunits (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, and *nad6*), ribosomal protein of the small ribosomal subunit (*rps3*) incorporated into a group I intron, 26 tRNAs, the fungal mitochondrial RNase P (*rnpB*), and small and large ribosomal RNAs. Comparative analysis of this mtDNA with previously sequenced mitochondrial genomes from several species of the *Penicillium* group revealed that *Penicillium* sp. has a unique gene order, which is not shared with any other *Penicillium* species. However, it presents an extensive similarity in its characteristics such as size, and genetic content.

Keywords: mitogenome, mitochondrial DNA, mtDNA, *Penicillium* sp. 658F5R-AM.

Introduction

Mitochondria is an essential organelle of eukaryotic cells and is intimately involved in many processes critical for cell survival and reproduction. The principal function of mitochondria is the production of energy via oxidative phosphorylation [i.e., adenosine triphosphate (ATP) production] (Saraste, 1999). In addition to metabolism and energy-producing function, mitochondria are also involved in other processes such as cell cycle, apoptosis, maintenance of ionic homeostasis, intermediary metabolism, and stress response (Basse, 2010; Burger et al., 2003; Chatre & Ricchetti, 2014).

The content of mitogenomes is highly conserved and typically characterized by the presence of 14 conserved protein-coding genes involved in electron transport (cytochrome oxidase subunits 1, 2, and 3; NADH dehydrogenase subunits 1, 2, 3, 4, 4L, 5, and 6) and ATP synthesis (ATP synthesis subunits 6, 8 and 9; and apocytochrome b). Furthermore, the mitochondrial genome usually has a small-subunit and large-subunit ribosomal RNA genes, a set of transfer RNA (tRNA) genes, and open reading frames of unknown function (uORFs) (Aguileta et al., 2014; Al-Reedy et al., 2012; Bullerwell & Lang, 2005; Torriani et al., 2014). Despite the relatively conserved genetic content, structural changes in the genome caused by the insertion of repetitive elements, gain or loss of intron, and gene transfers to the nucleus often lead to variations in mitogenome size (Burger et al., 2003).

The mechanisms underlying structural variations in fungal mitochondrial genomes and their correlation with the timeline of fungal divergence remain inadequately understood. Nevertheless, the growing availability of mitochondrial genome sequences in public databases holds the potential to elucidate the factors driving mitogenomic variation (Sandor et al., 2018). Mitochondria are generally accepted to have a common origin and play a significant role in phylogenetic studies.

Penicillium has a worldwide distribution and is one of the most common fungi found in several habitats, such as soil, vegetation, air, indoor environments, and food products. The literature has reported various species of *Penicillium* genus, and according to Visagie et al. (2014) and Torres-Garcia et al. (2022), about 483 species are accepted and divided into 26 sections.

Additionally, in agriculture, *Penicillium* spp. are of great importance because they can promote plant growth in various crops such as wheat (Bhatt et al., 2016), cucumber (Babu et al., 2015), corn (Yin et al., 2015), and rice (Khan et al., 2008); control diseases caused by different phytopathogens, such as *Phytophthora* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium* spp., and *Fusarium oxysporum* (Kumar et al. 2019; Ma et al., 2008); control pests in different crops, or insects that act as transmitting agents (Babu et al. 2018); reduce pollution from chemical and metallic pesticides residues (Khan & Lee, 2013) and induce resistance in plants (Qi et al., 2019; Zheng et al., 2017).

The utilization of microorganisms as biological control agents and plant growth promoters within the agricultural sector necessitates a comprehensive understanding of the biological and ecological principles governing their behavior in natural environments. The accelerated progress in sequencing technologies has significantly expanded the genome sequencing and analysis of *Penicillium* species. The chromosomal genetic data thus obtained are actively scrutinized to elucidate the molecular regulatory processes and evolutionary mechanisms inherent to this genus (Chi et al., 2021; Fisher et al., 2022; Grijseels et al., 2016). Data obtained from mitochondrial DNA (mtDNA), including gene content, gene arrangement, and exon-intron structure, along with molecular phylogenetic analyses based on individual or concatenated mitochondrial protein sequences, have significantly expanded our understanding of *Penicillium* (Sun et al., 2011; Woo et al., 2003). However, endophytic *Penicillium* species are still not well described. To date, only one endophytic *Penicillium* mitochondrial genome sequence is available in the GenBank database on NCBI, i.e., that of *Penicillium polonicum* (GenBank accession no. NC0301721) (Zhang et al., 2017). The characterization and comprehensive analysis of these endophytic *Penicillium* mitochondrial genomes is still not conducted.

Araújo et al. (2018) isolated and analysed the diversity of endophytic fungi from leaves, stems, and roots of *Hevea brasiliensis* trees from the Brazilian Amazon rainforest. Among the fungi that were isolated, *Penicillium* sp. was identified at the species level and stood out in terms of the potential to produce metabolites of interest for industry and sustainable development of agribusiness. Here, we reveal the mitochondrial genome of *Penicillium* sp. and use genomic comparative analysis to explore its polymorphisms and further confirm the evolutionary relationships among the species of *Penicillium*.

Materials and methods

Fungal isolate, DNA sequencing, and mitochondrial genome assembly

Penicillium sp. obtained from rubber trees (*Hevea brasiliensis*) from the Brazilian Amazon Forest (Araújo et al. 2018; Araújo et al. 2020) was deposited in the collection of the Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms at the Universidade Federal de Viçosa and was registered in the National System of Genetic Heritage Management – SisGen, with access A3DE980.

Penicillium sp. was cultivated on a cellophane paper disc placed on potato dextrose agar (PDA) medium at 28 °C for 24h. Mycelia were collected with a spatula and used for extracting genomic DNA (Specht et al., 1982). The quality and quantity of the extracted DNA was assessed using DNA agarose gel electrophoresis (Sambrook, 2001) and Qubit assay using a Qubit™ 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States), respectively. The mtDNA and nuclear genome was sequenced using Oxford Nanopore PromethION.

The quality of sequencing data was assessed using the reports of FastQC version 0.12.0 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>). Adapter sequences were detected and removed from sequencing data using the “auto-detection” setting of TrimGalore version 0.6.7 (Krueger et al., 2021). Then, reads were trimmed for quality and filtered for length using Trimmomatic version 0.39 (Bolger et al., 2014) by selecting the following parameters: HEADCROP: 10, CROP: 140, SLIDINGWINDOW: 4:20, and MINLEN: 100.

The *de novo* assembly of the genome was made using the SPAdes v3.11.1 (Bankevich et al., 2012) and was tested all odd k-mers between 21 and 127. The BLASTn tool of BLAST version 2.13.0 (Altschul et al., 1990) as used to identify the mitogenome sequence by comparing all the assembled contigs with the reference mitochondrial genomes of the NCBI Organelle Genome Resources database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/organelle>).

Annotation and analysis of the *Penicillium* sp. mitochondrial genome

Genes were predicted using MFannot tool (<https://megasun.bch.umontreal.ca/apps/mfannot/>) predicted the genes of the using the genetic code table number 4, which includes the genetic code of mitochondrial genomes of filamentous fungi. We manually revised each predicted by aligning its sequence with mitochondrial gene sequences from closely related species using the BLASTn tool. The ARWEN version 1.2.3.c (Laslett & Canbäck, 2008) was used to predict tRNAs and their secondary structures with default parameters. The Codon Usage tool (http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html) was used to predict the most frequently used codons and amino acids using the genetic code table 4.

The GenomeVx tool (<http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx/>) as used to plot the position and orientation of each annotated gene in the schematic representation of the mitochondrial genome of *Penicillium* sp.

Comparative genomics and phylogenetic analysis

We compared the genomic features of the mitochondrial genome of *Penicillium* sp. to the 26 reference mitogenomes of *Penicillium* species available in the NCBI Organelle Genome Resources database. Identification of the selected fungal species and accession numbers of their mitochondrial genomes are in Supplementary Table 1. The Clincker v.0.0.27 (Gilchrist & Chooi, 2021) was used to align the *Penicillium* sp. mitochondrial genome to the *Penicillium* species mitogenomes to assess the synteny of the orthologous genes and the conservation among them.

A Bayesian phylogenetic analysis was performed to evaluate the evolutionary relationship of the *Penicillium* sp. mitochondrial genome with other *Penicillium* species. The complete mitochondrial genomes of 13 species of *Penicillium* genus presents in the NCBI Organelle Genome Resources database were used in the analyses: *P. digitatum* Pd1 (NCBI accession number CM001644), *P. digitatum* PHI26 (CM001645), *P. digitatum* Pd01-ZJU pd01 (NC_015080), *P. expansum* (NC_079663), *P. solitum* 20-01 (NC_016187), *P. polonicum* (NC_030172), *P. nordicum* UASWS BFE487 (KR952336), *P. roqueforti* DTO 006-G1 (CM041222), *P. roqueforti* CBS 147332 (CM041223), *P. chrysogenum* P2niaD18

(CM002802), *P. canescens* (NC_059911), *P. oxalicum* CCTCC M 20211309 (CP088343), and *P. citrinum* (NC_047444).

The alignment of mitochondrial genomes was performed using MAFFT v.7.505 (Katoch & Stanley, 2013) using a global pairwise alignment with 100,000 iterations of refinement parameters to improve the alignment. To expedite the construction of the phylogenetic tree, the trimAl v.1.4.rev15 (Capella-Gutiérrez et al., 2009) was employed to trim the alignment to remove all positions containing gaps, and the ModelTest-NG v.0.1.7 (Darriba et al., 2020) was used to select model of nucleotide substitution GTR+I+G. The MrBayes version 3.2.7a (Ronquist et al., 2012) was applied to estimate a phylogenetic tree using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method in four runs with 10,000,000 generations and a sampling frequency of 1,000. After analysis of parameters convergence, we burnt 1% of the generated trees to produce the consensus tree.

Results

Genomic features of the *Penicillium* sp. mitochondrial genome

The mitochondrial genome of *Penicillium* sp. is a circular DNA molecule of 27,999 bp, containing 14 genes related to the oxidative phosphorylation (*atp6*, *atp8*, *atp9*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *cob*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*); 26 genes encoding for transfer RNAs, two ribosomal RNAs [one encoding to the small subunit (*rrns*) and other for the large subunit (*rrnl*)], ribosomal protein 3 (*rps3*) incorporated into a group I intron, RNase P (*rnpB*); and three additional open reading frames (*orf* genes) encoding hypothetical proteins. All genes are in the heavy strand (H-strand) with a clockwise direction of transcription (Figure 1).

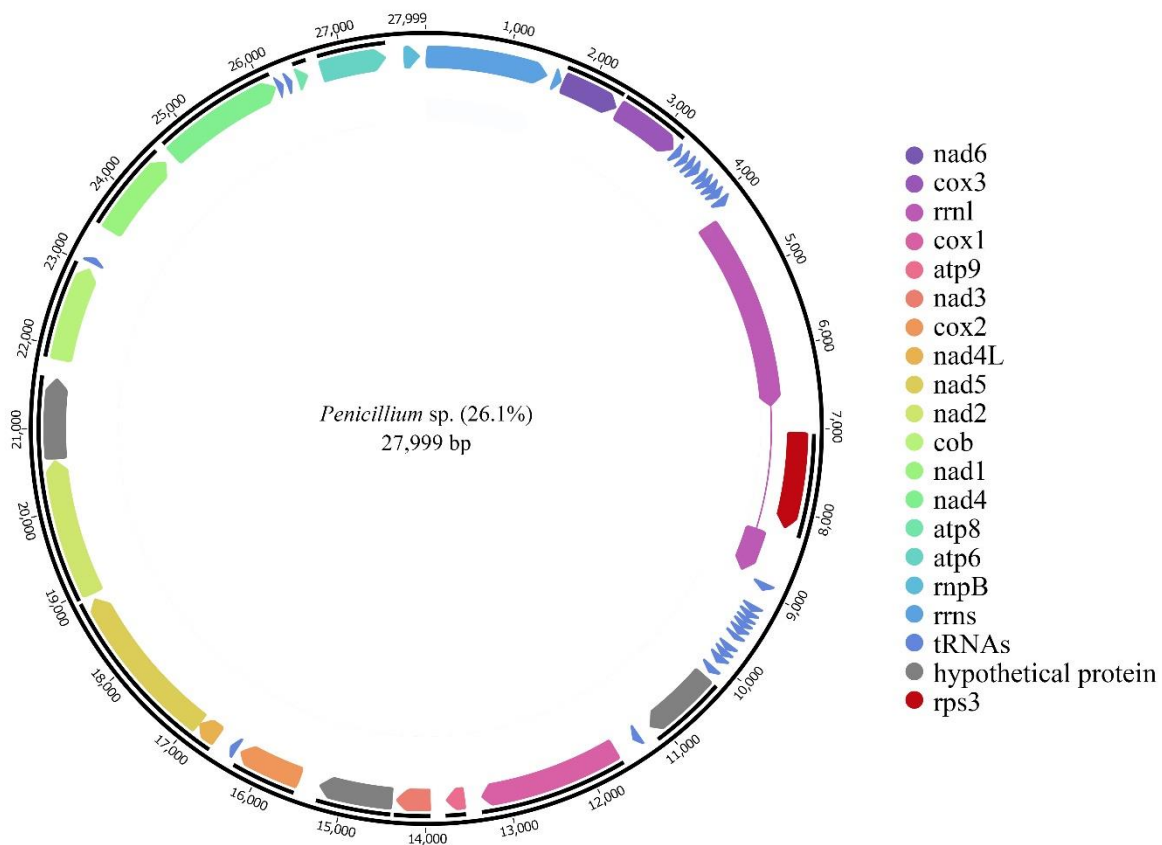


Figure 1: Annotated circular map of the *Penicillium* sp. mitochondrial genome. Every gene is depicted using a separate color block. The mitochondrial genome of *Penicillium* sp. is a circular-mapping DNA molecule containing 27,999 base pairs. It encodes a characteristic set of mitochondrial proteins such as ATP synthase subunits 6, 8, and 9, cytochrome oxidase subunits I, II, and III, apocytochrome b, reduced nicotinamide adenine dinucleotide ubiquinone oxidoreductase subunits, ribosomal protein of the small ribosomal subunit incorporated into a group I intron, 26 tRNAs, the fungal mitochondrial RNase P, and small and large ribosomal RNAs.

The overall nucleotide compositions of the complete mitochondrial genome are A (36,44%), T (37,47%), G (14,77%), and C (11,32%), meaning the proportion of AT content (73,91%) was $\approx 2,86$ times higher than that of GC content (25,76%). All 14 conserved core protein-coding genes are 13,155 bp in size related to three ATP synthases, one apocytochrome b, three cytochrome c oxidases, and seven NADH dehydrogenases. Of these genes, *nad5* (1,980 bp) is the longest, and the shortest is *atp8* (147 bp) (Table 1).

Table 1: List of mitochondrial genes annotated in *Penicillium* sp.

Gene	Position	Length (bp)
<i>rns</i>	1-1454	1454
<i>trnK</i> (GTA)	1570-1654	85
<i>nad6</i>	1680-2381	702
<i>cox3</i>	2424-3233	810
<i>trnK</i> (TTT)	3272-3343	72
<i>trnG</i> (GTC)	3376-3446	71
<i>trnG</i> (TCC)	3469-3539	71
<i>trnD</i> (GTC)	3552-3624	73
<i>trnS</i> (GCT)	3671-3751	81
<i>trnW</i> (TCA)	3752-3823	72
<i>trnI</i> (GAT)	3848-3919	72
<i>trnS</i> (TGA)	3924-4009	86
<i>trnP</i> (TGG)	4057-4128	72
<i>rrnl</i>	4217-6703/8389-8876	2975
<i>rp3</i>	7066-8265	1200
<i>trnT</i> (TGT)	8920-8990	71
<i>trnE</i> (TTC)	9218-9291	74
<i>trnV</i> (TAC)	9293-9365	73
<i>trnM</i> (CAT)	9368-9438	71
<i>trnM</i> (CAT)	9442-9512	73
<i>trnL</i> (TAA)	9519-9600	82
<i>trnA</i> (TGC)	9606-9677	72
<i>trnF</i> (GAA)	9761-9833	73
<i>trnL</i> (TAG)	9846-9928	83
<i>trnQ</i> (TTG)	9941-10013	73
<i>trnM</i> (CAT)	10099-10169	71
<i>orf297</i>	10242-11135	894
<i>trnH</i> (GTG)	11309-11380	72
<i>cox1</i>	11630-13351	1722
<i>atp9</i>	13551-13775	225
<i>nad3</i>	13961-14368	408
<i>orf291</i>	14410-15285	876
<i>cox2</i>	15561-16332	762
<i>trnR</i> (ACG)	16386-16456	71
<i>nad4L</i>	16657-16926	270
<i>nad5</i>	16926-18905	1980
<i>nad2</i>	18959-20632	1674
<i>orf317</i>	20649-21602	954
<i>cob</i>	21833-22990	1158
<i>trnC</i> (GCA)	23056-23126	71
<i>nad1</i>	23505-24560	1056
<i>nad6</i>	24682-26148	1467
<i>trnR</i> (TCT)	26192-26262	71
<i>trnN</i> (GTT)	26294-26364	71
<i>atp8</i>	26437-26583	147
<i>atp6</i>	26742-27515	774

<i>rpnB</i>	27743-27924	182
-------------	-------------	-----

The *rrns* gene for small subunit ribosomal RNA and the *rrnL* gene for large subunit ribosomal RNA are located on the H-strand with lengths of 1,454 bp and 4,660 bp, respectively. The *rrns* gene is between *rnpB* and *trnY*, and the *rrnL* gene positions superpose the *rps3*. The *rps3* gene positions itself as an internal ORF within the boundaries of the *rrnL* gene. Three Open Reading frames without predicted functions (*orf291*, *orf297*, and *orf317*) and the ORF coding for a putative *rnpB* were also found.

All 26 tRNAs are free-standing in the H-strand, and the average length of the tRNA genes ranges from 71 bp (*trnT*) to 86 bp (*trnS*). The total length of the tRNA genes (*trn* genes) is 1,927 bp, accounting for $\approx 6,88$ % of mitochondrial genome size. Some *trn* genes show multiple copies, and there are three copies of the *trnM* gene coding for methionine with the same codon (*trnM* [CAU]), two *trnR* genes coding for arginine (one copy with *trnR* [ACG] and one copy with *trnR* [UCU]), two *trnG* genes coding for glycine (one copy with *trnG* [ACC] and one copy with *trnG* [UCC]), two copies of *trnL* gene coding for leucine (one copy with *trnL* [UAA] and one copy with *trnL* [UAG]), and two copies *trnS* gene coding for serine (one copy with *trnS* [GCU] and one copy with *trnS* [UGA]). Five of the 26 tRNAs of *Penicillium* sp. presented a long variable arm (*trnK*, two *trnS*, and two *trnL*) (Figure 2).

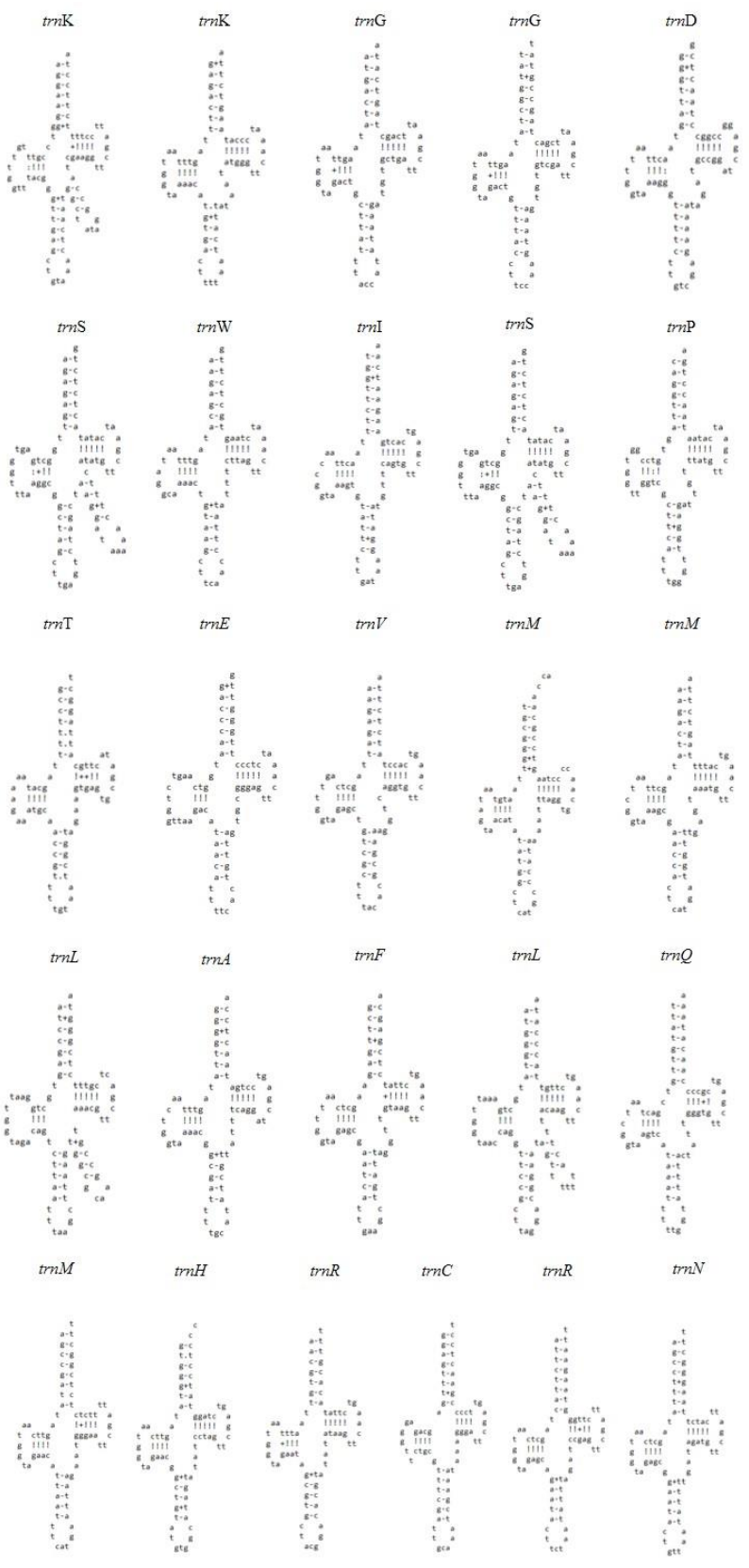


Figure 2: Putative secondary structure of the 26 mitochondrial tRNAs from *Penicillium* sp.

Codon preference analysis was conducted on protein-coding genes (PCGs). As shown in Figure 3, that the relative synonymous codon usage (RSCU) value of the start codon (AUG) was 1, the PCGs of the *Penicillium* sp. mitochondria genome also had a common codon usage preference. For example, the codon had a high preference for the use of TTA (Leu), and its RSCU value was the highest among PCGs in the mitochondrial genome, reaching 3.16, followed by the preference for arginine (Arg) and serine (Ser) for the use of AGG and AGT, and its RSCU value was 2.2 and 2.17, respectively.

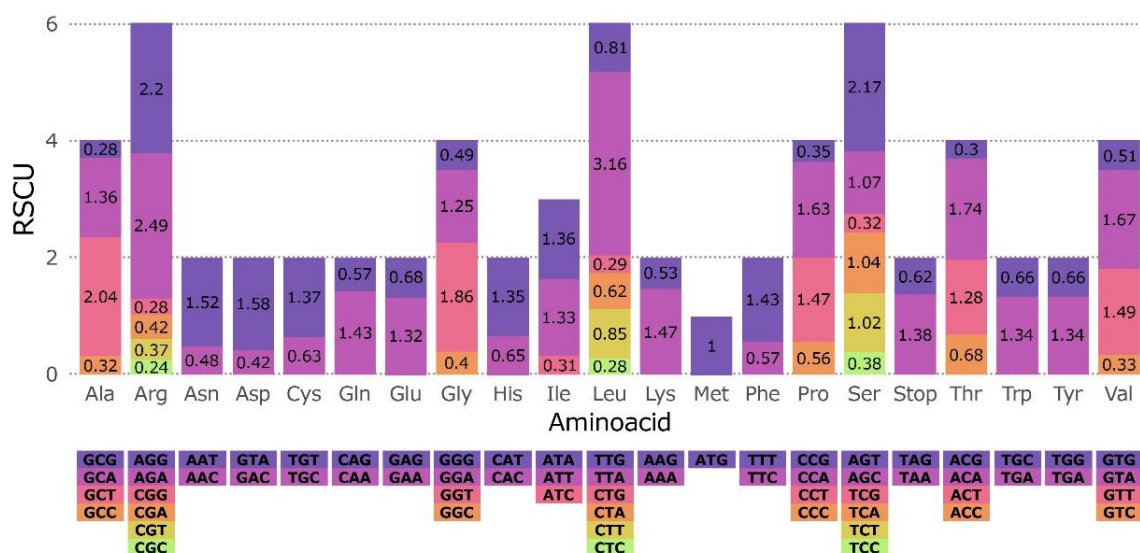


Figure 3: Codon usage in the mitochondrial genome of *Penicillium* sp. The codon usage count is plotted on the y-axis.

Comparative Analyses

The comparative analysis of the complete mitochondrial genome of *Penicillium* sp. with mitogenomes of *Penicillium* species revealed low variation in sequence length and gene content. Of these mitogenomes, *P. roqueforti* DTO 012-A1 and *P. roqueforti* DTO 012-A8 have 3,298 bp more, and *P. expansum* has 2,503 bp less when compared to the mitogenome of *Penicillium* sp. The GC content of the *Penicillium* sp. (25.76%) was lower than *P. solitum* 20-01 (26.80%) and higher than *P. chrysogenum* P2niaD18 (24.70%).

Most *Penicillium* mitogenomes contain the *rps3* gene as an intronic-ORF in a group I intron within the *rrnL* gene, except *P. solitum* where no *rps3* gene was found. Some strains of *P. roqueforti* show genes encoding homing endonucleases GIY-YIG and LAGLIDADG in

fusion with *atp6* and *cox1* genes, respectively. Synteny analysis revealed that the mitochondrial genomes of *Penicillium* sp. and other *Penicillium* species are collinear and share a conserved gene arrangement, but do not share a gene order (Figure 4). Gene order analysis revealed that *Penicillium* sp. has a unique gene order, that is, it does not share it with any other *Penicillium* species. While *P. expansum* and *P. chrysogenum* share the same genetic order between them, as do *P. digitatum*, *P. canaescens* and *P. polonium*. *Penicillium solitum* and *P. nordicum* also share the same gene order, but differ considerably among the other *Penicillium* species. *Penicillium* sp. and *P. oxalicum* are the only ones that present unknown functional ORFs in the gene order among the *nad3-cox2* and *nad2-cob* genes and only *Penicillium* sp. have present unknown functional ORF in the gene order among the *rrnl-cox1*.

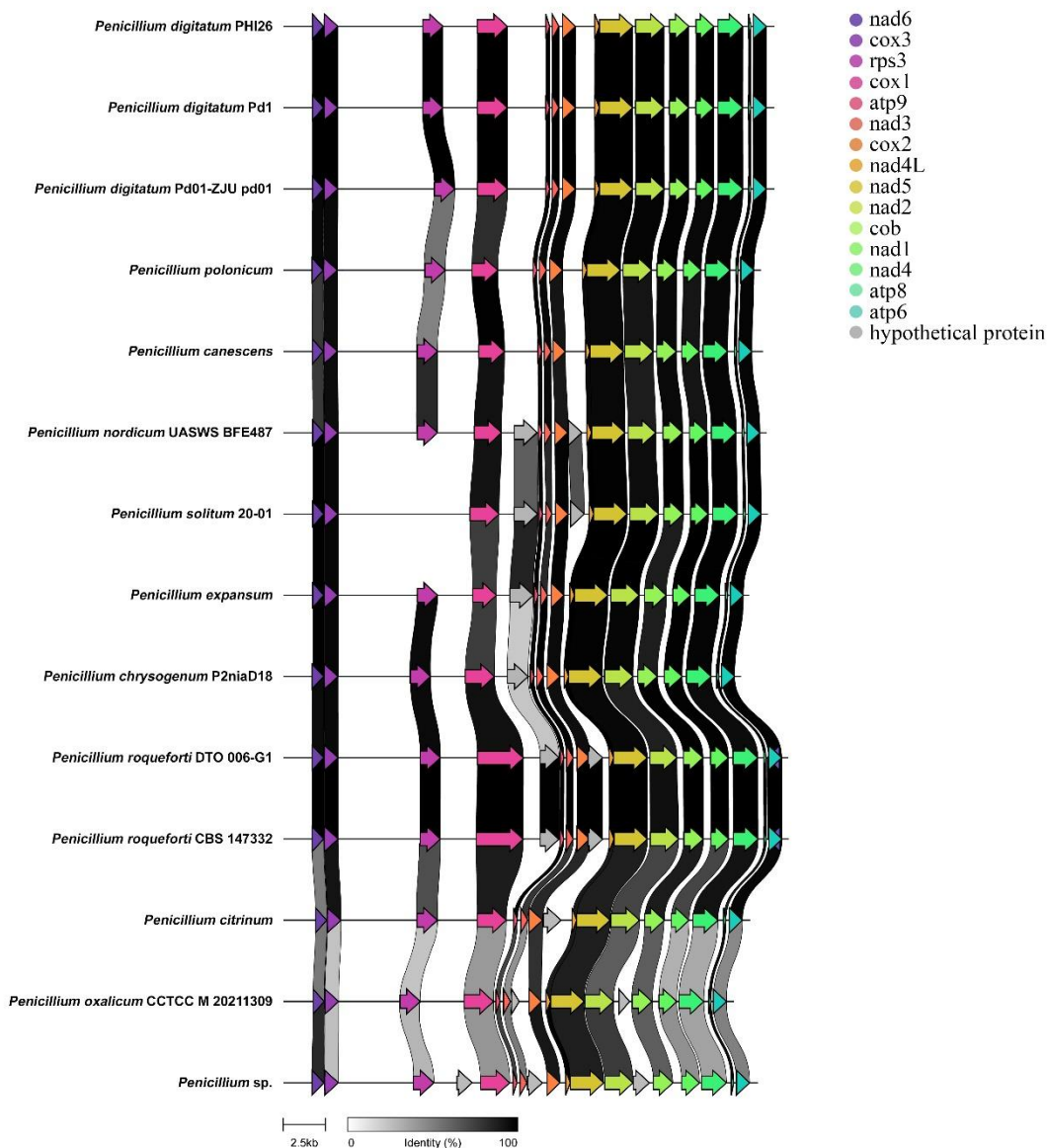


Figure 4: Comparative analysis of the mitogenomic genetic order of 14 *Penicillium* species. Synteny analysis revealed that the mitochondrial genomes of *Penicillium* sp. and other *Penicillium* species are collinear and share a conserved gene arrangement, but do not share a gene order. Gene order analysis revealed that *Penicillium* sp. has a unique gene order, that is, it does not share it with any other *Penicillium* species. *Penicillium expansum* and *P. chrysogenum* share the same genetic order between them, as do *P. digitatum*, *P. canescens* and *P. polonium*. *Penicillium solitum* and *P. nordicum* also share the same gene order, but differ considerably among the other *Penicillium* species. *Penicillium* sp. and *P. oxalicum* are the only ones that present unknown functional ORFs in the gene order among the *nad3-cox2* and *nad2-cob* genes and only *Penicillium* sp. have present unknown functional ORF in the gene order among the *rrnl-cox1*.

The phylogenetic analysis of *Penicillium* species mitochondrial genomes revealed two main branches with all nodes supported by high values of posterior probabilities (PP>99) (Figure 5). The *Penicillium* sp. is in a monophyletic clade with *P. oxalicum* CCTCC M 20211309 and the same branch of the *P. citrinum*.

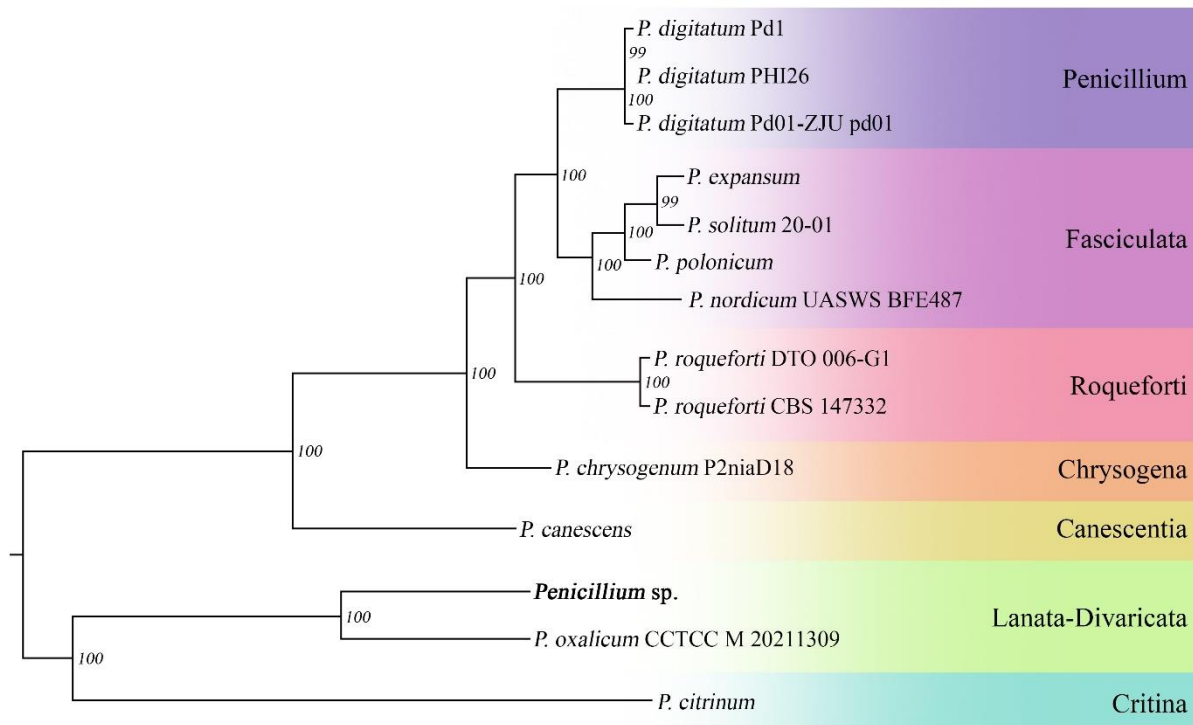


Figure 5: Phylogenetic tree based on sequences of 15 protein-coding genes from 14 species of *Penicillium* fungi. The ModelTest-NG v.0.1.7 was used to select model of nucleotide substitution GTR+I+G. The MrBayes was applied to estimate a phylogenetic tree using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method in four runs with 10,000,000 generations and a sampling frequency of 1,000. After analysis of parameters convergence, we burnt 1% of the generated trees to produce the consensus tree.

Discussion

The fungal mitogenomes are among the most variable mitogenomes of eukaryotic groups (Formey et al., 2012). The size variations of mitogenomes were mainly due to the variability in the size of intergenic regions, the number of introns, and open reading frames (ORFs) encoding hypothetical proteins (Bullerwell et al., 2003; Joardar et al., 2012; Sethuraman et al., 2009). Compared to *Penicillium* sp. (27.999 bp), *P. roqueforti* DTO 012-

A1 and *P. roqueforti* DTO 012-A8 (31.297 bp) had the largest mitogenome, while the *P. expansum* (25.496 bp) was the smallest mitogenome. The variation of introns is considered one of the main factors resulting in the variability of mitogenome size in *Penicillium*. The mitogenomes of *P. roqueforti* DTO 012-A1 and *P. roqueforti* DTO 012-A8 contained the most introns (4 introns), while we detected only one intron in the remaining mitogenome of *Penicillium* sp. and in the other mitogenomes of *Penicillium*. We also found that the size difference between the mitogenome of *P. roqueforti* DTO 012-A1 / *P. roqueforti* DTO 012-A8 and *Penicillium* sp. and *P. expansum* was mainly due to the increase in open reading frames (ORFs) encoding hypothetical proteins. *Penicillium roqueforti* DTO 012-A1 and *P. roqueforti* DTO 012-A8 has five ORFs encoding hypothetical protein, while *Penicillium* sp. and *P. expansum* have three and one ORF encoding hypothetical protein, respectively. Therefore, both the intronic region and ORFs encoding hypothetical protein contributed to the expansion and contraction of mitogenomes in *Penicillium* species.

In addition to the variations in size of mitochondrial genomes, the genes content and gene order may be different among fungal species. In this study, the mitogenomes of *Penicillium* species were compared. The gene content and gene order of the *Penicillium* sp. mitochondrial genome being different to the mitochondrial genome of the other *Penicillium* species evaluated, as shown in Figure 4. The conserved genes, such as subunits of ATP synthase, cytochrome oxidase, NADH dehydrogenase and apocytochrome b, tend to maintain a pattern in the content and gene order within different *Penicillium* species. Furthermore, the number of genes and GC content of the mitochondrial genome of *Penicillium* sp. are also within the average of the other mitochondrial genomes used as reference. With few variations in the number of tRNAs genes, where the mitogenome of *Penicillium* sp. has 26 tRNAs, the largest number being 27 tRNAs from *P. roqueforti* DTO 012-A1/ *P. roqueforti* DTO 012-A8 and the smallest number being 22 tRNAs from *P. oxalicum* CCTCC M 20211309. The tRNA gene set is sufficient to decode all c6dons presente in protein-coding genes, and does not require import of missing tRNAs from cytosol.

The gene arrangement of the mitogenome can serve as a reference to analyze the species phylogenetic status and evolution (Bullerwell & Lang, 2005; Burger et al., 2003; Li et al., 2018). However, mitochondrial gene rearrangement in fungi has still been poorly studied, mainly due to the low number of fungal mitogenomes available in databases (Sayers et al., 2019). Joardar et al. (2012) compared the order of mitochondrial genes of two species of

Penicillium and obtained similar results, and they found tiny differences in the order of genes based on the distribution of genes coding for conserved proteins, genes for tRNA, and rRNAs. Malik et al. (2024) compared the gene order of *P. expansum* with other *Penicillium* species and found significant differences. In this study, we compared mitogenomes of *Penicillium* species and the results showed that the gene order among *Penicillium* is quite variable. Mitochondrial genome organization is likely beneficial for efficient mitochondrial function and for supporting the metabolic versatility of *Penicillium*, which includes many industrially important species.

The mitochondrial genome has emerged as a valuable tool for the study of phylogeny, population genetics, and taxonomy, due to its autonomy from the nuclear genome and its accelerated evolutionary rate (Li et al., 2019). Few mitochondrial molecular markers have been employed in studying its population genetics or phylogeny (Li et al., 2020). We obtained tree topologies showing phylogenetic relationships amongst 14 species of *Penicillium* based on the alignment of their mitochondrial genomes. This analysis recovered a well-supported tree topology, consistent with the classifications already described, where we observed the formation of 7 group/sections: *Penicillium* (*P. digitatum* Pd1, *P. digitatum* PHI26, and *P. digitatum* Pd01-ZJU pd01), Fasciculata (*P. expansum*, *P. solitum* 20-01, *P. polonicum* and *P. nordicum* UASWS BFE487), Roqueforti (*P. roqueforti* DTO 006-G1 and *P. roqueforti* CBS 147332), Chrysogena (*P. chrysogenum* P2niaD18), Canescentia (*P. canescens*), Lanata-Divaricata (*P. hevea* sp. nov. 658F5R-AM and *P. oxalicum* CCTCC M 20211309), and Critina (*P. citrinum*). The resulting phylogenetic tree (Figure 5) shows a grouping between *Penicillium* sp. and *P. oxalicum* CCTCC M 20211309. This result is consistent with the *Penicillium* phylogeny based on nuclear genes obtained in the studies Steenwyk et al. (2019) and Araújo et al. (2024) (data not yet published). According to the analysis, *Penicillium* sp. belongs to the Lanata-Divaricata section. More mitogenomes are, however, needed to assess comprehensively the origin and evolution of the *Penicillium* species.

Conclusion

This study reports for the first time the mitochondrial genome of an endophytic fungus, *Penicillium* sp., and its comparative analysis with other *Penicillium* species. The mitogenome of *Penicillium* species, genes are conserved to maintain their cellular functions. It was observed that there is a variation in the order of genes between different species, where *Penicillium* sp. has a unique arrangement, that is, it does not share it with other species. Furthermore, through

mitochondrial genes it was possible to carry out phylogenetic analysis, which could function as markers.

Referências

- Aguileta G, De Vienne DM, Ross ON, Hood ME, Giraud T, Petit E, Gabaldón T (2014). High variability of mitochondrial gene order among fungi. *Genome Biology and Evolution*, 6(2):451–465. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu028>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Al-Reedy RM, Malireddy R, Dillman CB, Kennell JC (2012). Comparative analysis of *Fusarium* mitochondrial genomes reveals a highly variable region that encodes an exceptionally large open reading frame. *Fungal Genetics and Biology*, 49(1):2–14. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.11.008>.
- Araújo KS, Brito VN, Veloso TGR, Leite TS, Pereira OL, Mizubuti ESG, Queiroz MV (2018). Diversity of culturable endophytic fungi of *Hevea guianensis*: A latex producer native tree from the Brazilian Amazon. *African Journal of Microbiology Research*, 12(42):953–964. <https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8980>.
- Babu AG, Kim SW, Yadav DR, Hyum U, Adhikari M, Lee YS (2015). *Penicillium menonorum*: A novel fungus to promote growth and nutrient management in cucumber plants. *Mycobiology*, 43(1):49–56. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.1.49>.
- Babu JV, Popay AJ, Miles CO, Wilkins AL, Menna ME, Finch SC (2018). Identification and structure elucidation of Janthitrem A and D from *Penicillium janthinellum* and determination of the Tremorgenic and anti-insect activity of Janthitrem A and B. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 66(50):13116–13125.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5):455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Basse CW (2010). Mitochondrial inheritance in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6): 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.003>.
- Bhatt SC, Debnath S, Pareek N (2016). Assessment of *Penicillium bilaii* inoculation in wheat (*Triticum aestivum* L.) for improving growth, yield and phosphorus availability in Mollisols of India. *Journal of Applied and Natural Science*, 8(1):358–367. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.800>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Bullerwell CE, Forget L, Lang BF (2003). Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 31(6):1614–1623. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg264>.
- Bullerwell CE, Lang BF (2005). Fungal evolution: The case of the vanishing mitochondrion.

- Current Opinion in Microbiology, 8(4):362–369.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.009>.
- Burger G, Gray MW, Lang BF (2003). Mitochondrial genomes: Anything goes. *Trends in Genetics*, 19(12):709–716. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.012>.
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. 25(15):1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>.
- Chatre L, Ricchetti M (2014). Are mitochondria the Achilles' heel of the Kingdom Fungi? *Current Opinion in Microbiology*, 20(1):49–54. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.001>.
- Chen Y, Ye W, Zhang Y, Xu Y (2015). High speed BLASTN: An accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic Acids Research*, 43(16):7762–7768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>.
- Chi BB, Lu YN, Yin PC, Liu HY, Chen HY, Shan Y (2021). Sequencing and Comparative Genomic Analysis of a Highly Metal-Tolerant *Penicillium janthinellum* P1 Provide Insights Into Its Metal Tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 12:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663217>.
- Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T (2020). ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution*. 37(1):291–294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>.
- Diao YZ, Chen Q, Jiang XZ, Houbraken J, Barbosa RN, Cai L, Wu WP (2019). *Penicillium* section Lanata-divaricata from acidic soil. *Cladistics*, 35(5):514–549. <https://doi.org/10.1111/cla.12365>.
- Fisher S, De Villers D, Du Plessis M, Hattingh K, Saulse C, Basson G, Barker A, Daniel AI, Al-Hashimi A, Hitzeroth A, Makhalanyane T, Mavumengwana V, Gokul A, Keyster M, Klein A (2022). Draft Whole-Genome Sequence of *Penicillium simplicissimum* A4, a Putative Endophyte from *Echium plantagineum*. *Microbiology Resource Announcements*, 11(11):10–11. <https://doi.org/10.1128/mra.00854-22>.
- Formey D, Molès M, Haouy A, Savelli B, Bouchez O, Bécard G, Roux, C (2012). Comparative analysis of mitochondrial genomes of *Rhizophagus irregularis* - syn. *Glomus irregulare* - reveals a polymorphism induced by variability generating elements. *New Phytologist*, 196(4):1217–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04283.x>.
- Gilchrist CLM, Chooi Y (2021). clinker & clustermap . js : automatic generation of gene cluster comparison figures. 37(January), 2473–2475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007>.
- Grijseels S, Nielsen J, Nielsen JC, Randelovic M, Nielsen KF, Workman M, Frisvad JC (2016). *Penicillium arizonense*, a new, genome sequenced fungal species, reveals a high chemical diversity in secreted metabolites. *Scientific Reports*, 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep35112>.
- Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, Kraak B, Hubka V,

- Bensch K, Samson RA, Frisvad JC (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 95:5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.
- Joardar V, Abrams NF, Hostetler J, Paukstelis PJ, Pakala S, Pakala SB, Zafar N, Abolude OO, Payne G, Andrianopoulos A, Denning DW, Nierman WC (2012). Sequencing of mitochondrial genomes of nine *Aspergillus* and *Penicillium* species identifies mobile introns and accessory genes as main sources of genome size variability. *BMC Genomics*, 13(1):1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-698>.
- Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4):772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Khan AL, Lee IJ (2013). Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. *BMC Plant Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-86>.
- Khan SA, Hamayun M, Yoon H, Kim HY, Suh SJ, Hwang SK, Kim JM, Lee IJ, Choo Y S, Yoon UH, Kong WS, Lee BM, Kim JG (2008). Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology*, 8:1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-231>.
- Kumar V, Soni R, Jain L, Dash B, Goel R (2019). Advances in Endophytic Fungal Research. In *Pharmaceuticals from microbes*. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-03589-1>.
- Krueger F, James F, Ewels P, Afyounian E, Weinstein M, Schuster-Boeckler B, Hulselmans G (2021). FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.10-add default decompression path. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5127898>.
- Laslett D, Canbäck B (2008). ARWEN: A program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 24(2):172–175. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm573>.
- Li Q, He X, Ren Y, Xiong C, Jin X, Peng L, Huang W (2020). Comparative Mitogenome Analysis Reveals Mitochondrial Genome Differentiation in Ectomycorrhizal and Asymbiotic *Amanita* Species. *Frontiers in Microbiology*, 11:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01382>.
- Li Q, Wang Q, Jin X, Chen Z, Xiong C, Li P, Zhao J, Huang W (2019). The first complete mitochondrial genome from the family *Hygrophoraceae* (*Hygrophorus russula*) by next-generation sequencing and phylogenetic implications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122:1313–1320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.091>.
- Li Q, Yang M, Chen C, Xiong C, Jin X, Pu Z, Huang W (2018). Characterization and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the medicinal fungus *Laetiporus sulphureus*. *Scientific Reports*, 8(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27489-9>.
- Ma Y, Chang Z, Zhao J, Zhou M (2008). Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper. *Biological Control*, 44(1):24–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.005>.

- Malik M, Malik F, Fatma T, Hayat MQ, Jamal A, Gul A, Faraz M (2024). The complete mitochondrial genome of *Penicillium expansum*: Insights into the fungal evolution and phylogeny. *Gene*, 910. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148315>.
- Qi X, Li X, Zhao J, He N, Li Y, Zhang T, Wang S, Yu L, Xie Y (2019). GKK1032C, a new alkaloid compound from the endophytic fungus *Penicillium* sp. CCCC 400817 with activity against methicillin-resistant *S. aureus*. *Journal of Antibiotics*, 72(4):237–240. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0144-5>.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres LD, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61(3):539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandor S, Zhang Y, Xu J (2018). Fungal mitochondrial genomes and genetic polymorphisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22):9433–9448. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9350-5>.
- Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283(5407):1488–1493. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1488>.
- Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Ostell J, Pruitt KD, Karsch-mizrachi I (2019). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 47(1):94–99. <https://doi.org/10.1093/nar/gky989>.
- Sethuraman J, Majer A, Friedrich NC, Edgell DR, Hausner G (2009). Genes within genes: Multiple LAGLIDADG homing endonucleases target the ribosomal protein S3 gene encoded within an rnl group i intron of ophiostoma and related taxa. *Molecular Biology and Evolution*, 26(10):2299–2315. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp145>.
- Specht CA, DiRusso CC, Novotny CP, Ullrich RC (1982). A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, 119(1):158–163. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90680-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90680-7).
- Steenwyk J, Shen X-X, Lind AL, Goldman GH, Rokas A (2019). A Robust Phylogenomic Time Tree for Biotechnologically and Medically Important Fungi in the Genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *ASM Journals*.10(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.00925-19>.
- Sun X, Li H, Yu D (2011). Complete mitochondrial genome sequence of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum* and comparative analysis of closely related species. *FEMS Microbiology Letters*, 323(1):29–34. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02358.x>.
- Torres-Garcia D, Gene J, Garcia D (2022). New and interesting species of *Penicillium* (*Eurotiomycetes*, *Aspergillaceae*) in freshwater sediments from Spain. *MycKeys*, 86:103–145. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.86.73861>.
- Torriani SFF, Penselin D, Knogge W, Felder M, Taudien S, Platzer M, McDonald BA, Brunner PC (2014). Comparative analysis of mitochondrial genomes from closely related *Rhynchosporium* species reveals extensive intron invasion. *Fungal Genetics and Biology*, 62:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.11.001>.
- Van Den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen, AJM, Garcia-

- Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WHM, Joardar V, Kiel JAW, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, Van Der Klei IJ, van Peij NNM, Veenhuis M, von Dohren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RAL (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology*, 26(10):1161–1168. <https://doi.org/10.1038/nbt.1498>.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert K A, Varga J, Yaguchi T, Samson RA (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1):343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- Wolfsberg TG, Schafer S, Tatusov RL, Tatusova TA (2001). Organelle genome resources at NCBI. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(3):199–203. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01773-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01773-4).
- Woo PCY, Zhen H, Cai JJ, Yu J, Lau SKP, Wang J, Teng JLL, Wong SSY, Tse RH, Chen R, Yang H, Liu B, Yuen KY (2003). The mitochondrial genome of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffeii* is more closely related to those of molds than yeasts. *FEBS Letters*, 555(3):469–477. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01307-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01307-3).
- Yin Z, Shi F, Jiang H, Roberts DP, Chen S, Fan B (2015). Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(12):913–923. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0358>.
- Zhang S, Wang XN, Zhang XL, Liu XZ, Zhang YJ (2017). Complete mitochondrial genome of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*: features and evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4):1593–1604. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8112-0>.
- Zheng YK, Miao CP, Chen HH, Huang FF, Xia YM, Chen YW, Zhao LX (2017). Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: Diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease. *Journal of Ginseng Research*, 41(3):353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.07.005>.

Material Suplementar

Tabela Suplementar S1: Lista de espécies de *Penicillium* que possuem genoma mitocondrial depositado no NCBI.

Nome do organismo	Tamanho(pb)	GC%	Número de acesso
<i>P. roqueforti</i> CBS 147318	29.812	25,3891	CM041224.1
<i>P. roqueforti</i> CBS 147355	29.811	25,3900	CM041226.1
<i>P. roqueforti</i> CBS 147332	29.827	25,3763	CM041223.1
<i>P. roqueforti</i> LCP 96.3914a	29.812	25,3891	CM041225.1
<i>P. roqueforti</i> CBS 147372	31.293	25,4753	CM041228.1
<i>P. roqueforti</i> DTO 006-G1	29.809	25,3984	CM041222.1
<i>P. roqueforti</i> DTO 012-A1	31.297	25,4657	CM041221.1
<i>P. roqueforti</i> CBS 147354	29.809	25,3984	CM041227.1
<i>P. roqueforti</i> DTO 012-A8	31.297	25,4657	CM041220.1
<i>P. roqueforti</i> CBS 147331	29.827	25,3763	CM041319.1
<i>P. roqueforti</i> DTO 012-A7	29.812	25,3891	CM041321.1
<i>P. roqueforti</i> DTO 027-I6	29.809	25,3984	CM041320.1
<i>P. roqueforti</i> CBS 147309	29.811	25,3900	CM041322.1
<i>P. roqueforti</i> DTO 006-G7	29.790	25,3944	CM041323.1
<i>P. roqueforti</i> UASWS P1	29.908	25,3945	KR952335.1
<i>P. roqueforti</i> UASWS P1	29.908	25,3945	NC_027416.1
<i>P. chrysogenum</i> P2niaD18	27.017	24,7067	CM002802.1
<i>P. oxalicum</i> CCTCC M 20211309	26.597	26,5143	CP088343.1
<i>P. canescens</i>	28.301	24,8401	NC_059911.1
<i>P. polonicum</i>	28.192	25,5640	NC_030172.1
<i>P. digitatum</i> Pd01-ZJU pd01	28.978	25,3399	NC_015080.1
<i>P. digitatum</i> Pd1	28.970	25,3435	CM001644.1
<i>P. digitatum</i> PHI26	28.977	25,3373	CM001645.1
<i>P. citrinum</i>	27.537	26,8076	NC_047444.1
<i>P. solitum</i> 20-01	28.601	25,4711	NC_016187.1
<i>P. nordicum</i> UASWS BFE487	28.520	25,4348	KR952336.1
<i>P. expansum</i>	25.496	24,8000	NC_079663

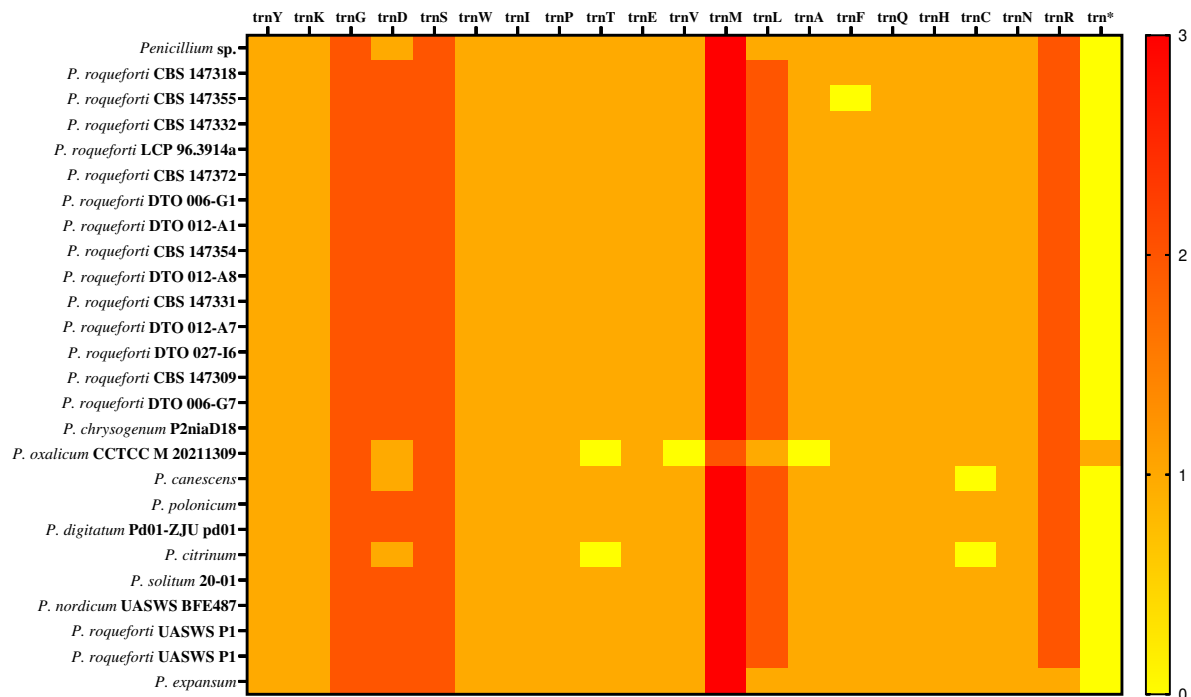


Figura Suplementar S1: Mapa de calor para determinar o número de tRNAs em espécies de *Penicillium*. A intensidade da cor reflete os valores do número de tRNAs, onde tons mais escuros indicam maiores quantidades de tRNAs.

Conclusões Gerais

Este trabalho revelou o grande potencial de *Penicillium* sp. como agente de biocontrole e promotor de crescimento vegetal para o feijão-comum. Na qual, *Penicillium* sp. apresenta várias características benéficas, como solubilização de fosfato, produção de fitohormônios, amônia, sideróforos e enzimas extracelulares, além de tolerância a concentrações de sal e eficiência na aquisição e translocação de nutrientes. Demonstrou também sua capacidade de inibir fitopatógenos através da produção de metabólitos secundários e compostos orgânicos voláteis.

Além disso, este trabalho incluiu uma análise do genoma completo de *Penicillium* sp. e a anotação funcional identificando CAZymes, *clusters* de metabólitos secundários e transportadores. Em particular, identificou o *cluster* e a produção do composto Andrastin A, que mostrou possível potencial como agente antimicrobiano.

E também, sendo o primeiro trabalho a descrever o genoma mitocondrial de um fungo endofítico dessa espécie, revelando variações únicas na ordem dos genes comparado a outras espécies de *Penicillium*.

Sendo assim, esse trabalho oferece uma base sólida para futuras investigações e possíveis aplicações biotecnológicas, destacando o potencial de *Penicillium* sp. no desenvolvimento de formulações para a agricultura.