

## Produção de peptídeos da classe dos peptaibols por *Trichoderma amazonicum*

Castro, Gleucinei dos Santos<sup>1</sup>; Silva, Gilvan Ferreira da<sup>2</sup>; Koolen, Hector Henrique Ferreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado do Amazonas, <sup>2</sup>Embrapa Amazônia Ocidental. <sup>3</sup>Universidade do Estado do Amazonas.  
Email: gleucinei@gmail.com

### Resumo

Fungos pertencem a um grupo de microrganismos que produz vários produtos naturais biologicamente ativos. As espécies do gênero *Trichoderma* possuem potencial para produzir moléculas da classe dos antibióticos denominados peptaibols. Esses microrganismos são capazes de produzir essas biomoléculas com extensa diversidade de sequências. Sua singularidade reside em ter aminoácidos não canônicos, como o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib) e Isovaline (Iva). A atividade antimicrobiana e antifúngica desses peptídeos é atribuída à indução de canais iônicos na bicamada lipídica dos organismos-alvo. Os peptídeos fúngicos são explorados por suas aplicações biotecnológicas na medicina humana e na proteção de plantas. Tendo em vista o potencial biotecnológico desses organismos e a diversidade de espécies com importância química, este estudo visou a caracterização química de peptaibols produzidos por um fungo amazônico. Neste estudo, o sequenciamento de peptaibols de 11 resíduos produzidos por *Trichoderma amazonicum* foi realizado por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* de alta resolução (LC-MS/MS). O estudo foi conduzido com *T. amazonicum*, isolado do fruto do açaí-do-amazonas (*Euterpe precatoria*). Evidenciou-se, o potencial químico da espécie, e possibilitou a biossíntese de moléculas potencialmente novas.

**Palavras-chave:** Espectrometria de massas, Peptídeos não ribossomais, Fungos amazônicos

### Introdução

Fungos endofíticos podem ser definidos, de maneira geral, como aqueles que em determinado período de sua vida, colonizam seus hospedeiros (plantas) sem causar sintomas visíveis de doenças (Pamphile et al. 2017; Rana et al. 2019). Esses microrganismos adentram nos tecidos vegetais por diversas fissuras naturais, como estômatos ou ferimentos nos tecidos (Peixoto et al. 2004).

Dentre os fungos mais frequentemente encontrados como endofíticos, destacam-se as espécies do gênero *Trichoderma* que ocorrem em diferentes ecossistemas, colonizando vários substratos, como solo e madeira em decomposição (Samuels et al. 2006; Zhang et al. 2007; Druzhinina et al. 2011; Druzhinina et al. 2012; Chaverri e Samuels 2013). Além disso, certas espécies são conhecidas como endofíticas de insetos e patógenos facultativos de humanos, demonstrando uma alta adaptabilidade a vários nichos ecológicos (Ruano-Rosa et al. 2016). A habilidade desobreviver a diversos ambientes facilita a presença desse fungo em várias regiões do planeta, devido aos seus mecanismos físico-químico na produção de enzimas e antibióticos permitindo eficiente utilização do substrato (Almeida et al. 2007; Jaklitsch 2009; Atanasova et al. 2013).

Espécies de *Trichoderma* são relatadas como predadores de fitopatógenos e seu processo de biocontrole envolve diferentes mecanismos ou uma combinação destes, como produção de antibióticos, micoparasitismo e competição por nutrientes (Mukherjee et al. 2013; Sood et al. 2020; Poveda et al. 2021; Ali et al. 2022). Um dos mecanismos de biocontrole utilizado pelos *Trichoderma* é a produção de peptídeos conhecidos como peptaibols, que agem na bicamada lipídica e bactérias e fungos (Chávez et al. 2017; Ramada et al. 2018). Os peptídeos não ribossômicos (NRPs) consistem em um grande grupo de metabólitos secundários que são biossintetizados por mega enzimas multimodulares, conhecidas como peptídeos sintetases não ribossômicas (NRPSs) (Daniel e Rodrigues Filho 2007).

Tendo em vista o crescente interesse nesta classe de moléculas promissoras, bem como o potencial de *Trichoderma* em produzi-las, este estudo objetivou a caracterização do perfil químico peptaibols produzidos por *T. amazonicum* MMSRG 38A, uma espécie pouco estudada sobre seu potencial biotecnológico.

### **Material e Métodos**

O isolamento do fungo MMSRG38A foi realizado mediante metodologia previamente descrita (Souza et al. 2004), de *Euterpe precatoria* e armazenados na micoteca do grupo de pesquisa em metabolômica e espectrometria de massas MMSRG.

A extração de DNA seguiu o método CTAB (Doyle e Doyle 1987) usando micélio cultivado em BDA por 3 dias a 28 °C em 125 rpm. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizadas para amplificação da região do espaçador interno transcrito (ITS) e sequências parciais dos genes elongation factor 1- $\alpha$  (ef-1 $\alpha$ ) foram preparadas utilizando o kit Easytaq (Synapse Biotechnology) com dois pares de primers: ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATG) (White et al. 1990), e iniciadores EF-1 $\alpha$ F (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF-1 $\alpha$ R (GGARGTACCAGTSATCATGTT); (O'donnell et al. 1998). A condição de PCR para amplificação de todos os loci foi: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, temperatura de hibridização a 57 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 1 min, extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%) para confirmação do comprimento do amplicon usando o marcador de 1kb (Invitrogen). A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas forward (F) e reverse (R) utilizando-se o programa MEGA 7. O alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando-se a ferramenta nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

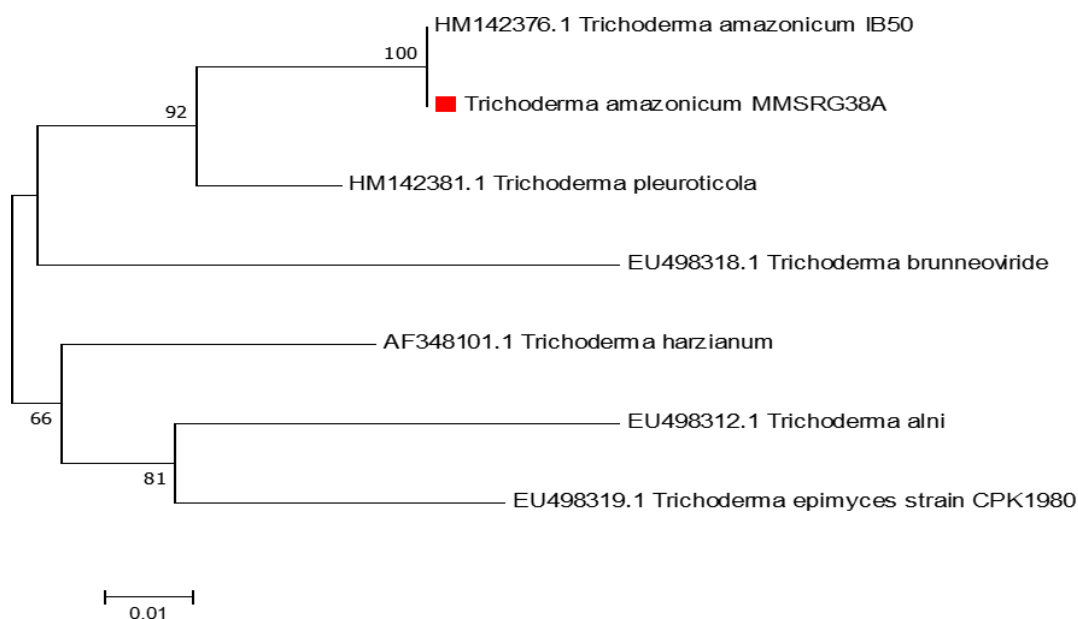
O isolado *T. amazonicum* (MMSRG 38A) foi inoculado em frascos do tipo Erlenmeyers contendo 20 g de arroz parboilizado autoclavado. Incubado por um período de 14 dias à temperatura ambiente (25 °C). O material fúngico foi extraído por maceração a frio diretamente com acetato de etila (AcOEt) durante a noite, obtendo-se o respectivo extrato (Fotso et al. 2018).

As análises LC-MS/MS foram realizadas com um cromatógrafo de sistema de cromatografia líquida Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução Thermo Scientific TM Q Exactive TM Plus (Waltham, MA, EUA). As análises de cromatografia líquida foram realizadas usando um Ascentis C18 Coluna expressa (100 x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m) (com uma coluna de proteção) (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) com formato de amônio (0,1% p/v) (fase móvel A): acetonitrila/ácido fórmico (0,1% p/v) (fase móvel B) a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min no modo de eluição gradiente da seguinte forma: B -15% (0-1 min); B 15-95% (1-16 min); B 95% (16-21 min); B 95-15% (21-22 min) e B 15% (22-30 min). A temperatura do forno foi mantida a 40 °C. Os parâmetros de ionização da fonte foram: tensão de spray 3,9 kV; temperatura

capilar 300 °C; Nível S-Lens 50, gás de bainha 50, gás auxiliar 15. As amostras foram analisadas na faixa de massa de varredura de  $m/z$  150 a 1000 na resolução de 35000 (varredura completa positiva e negativa) seguido por MS2 dependente de dados (experimentos ddMS2 Top3) usando uma resolução de 17500 e energia de colisão normalizada (NCE) escalonada em 35-50%.

## Resultados e Discussão

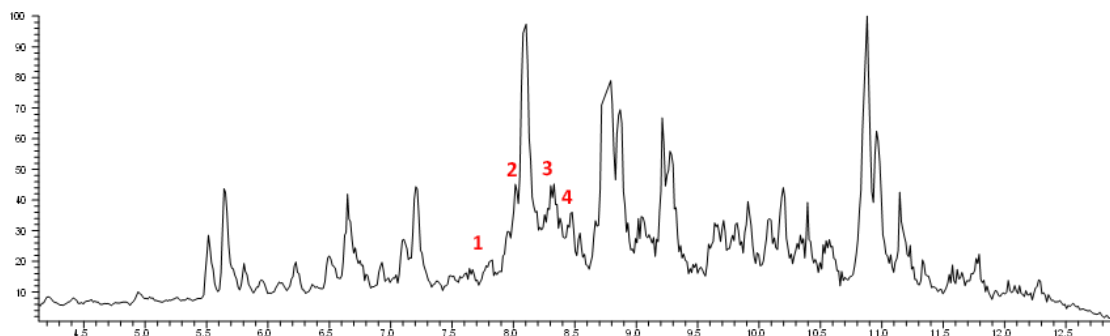
A identificação molecular preliminar com base na região, do fator de alongamento da tradução *tef1- $\alpha$* , localizou o isolado MMSRG 38A no clados *harzianum*, resultando na identificação do isolado MMSRG 38A como sendo a espécie *T. amazonicum* (Fig. 1). A literatura mostra que essa espécie é uma exímia produtora de enzimas como quitinase (Tameswari 2016) além de promover crescimento de plantas (Matarusu 2022).



**Figura 1.** Árvore filogenética do marcador *tef1- $\alpha$*  gerada pela análise Neighbor joining. O isolado MMSRG 38A obtidos neste estudo está destacado com um quadrado vermelho.

As altas  $m/z$  observadas em diversos picos do cromatograma de íons totais de *T. amazonicum* (MMSRG 38A) indicou que esta espécie nas condições avaliadas foi capaz de produzir compostos da classe dos peptídeos (Fig. 2). Os compostos eluindo nos referidos tempos apresentaram  $m/z$  1175,7764, 1189,7917, 1220,8339 e 1262,8805 respectivamente. A busca na literatura pelas duas últimas substâncias fúngicas com as mesmas  $m/z$  não apresentou resultados consistentes, o que nos leva a supor que se trata de novas moléculas.

A interpretação manual dos espectros de íons produtos indicou mistura complexa de NRPs da classe dos peptaibols. Alguns dos picos que possuem relação com peptaibols apresentaram moléculas protonadas  $[M+H]^+$ .



**Figura 2.** Cromatograma de íons totais dos compostos anotados. Os números indicam compostos anotados em ordem crescente de tempo de retenção (RT).

A análise de fragmentação por meio do experimento de varredura de íons produtos permitiu a identificação de dois peptaibols (Fig. 3 e 4). A identificação para as sequências de amino ácidos dos peptaibols hipomuricinas, analisou-se a fragmentação do composto com  $m/z$  1175.7764  $[M+H]^+$ , C<sub>58</sub>H<sub>102</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>, 1.8 ppm), como modelo para o peptaibols hipomuricina A4 (Fig. 3). No espectro de varredura de íons produtos, observam-se majoritariamente íons da série *b*, os quais compreenderam os íons de *b*<sub>10</sub> a *b*<sub>3</sub>, seguindo na direção da porção C-terminal para a N-terminal. Na porção C-terminal, as fragmentações  $m/z$  1175  $m/z$  961 (*b*<sub>10</sub>, - 214 u) confirmaram que esta porção é o aminoálcool leucinol com um resíduo de prolina. Posteriormente, foram observadas perdas características de resíduos de aminoácidos como alpha aminoisobutirico (Aib, - 85 u), leucina/isoleucina (Lxx, - 113 u), (Pro- 97 u), (Aib, - 85 u) e (Lxx, - 113 u) (Fig. 3). Além destes, o íon *b*<sub>1</sub> de  $m/z$  128.07 possibilitou caracterização da porção N-terminal, uma vez que corresponde ao agrupamento dos resíduos Aib-Gln com o grupo amino acetilado. Desta forma, a sequência da hipomuricina A3 foi determinada como Ac-Aib-Gln-Vxx-Lxx-Aib-Pro-Lxx-Lxx-Aib-Pro- Leuol.

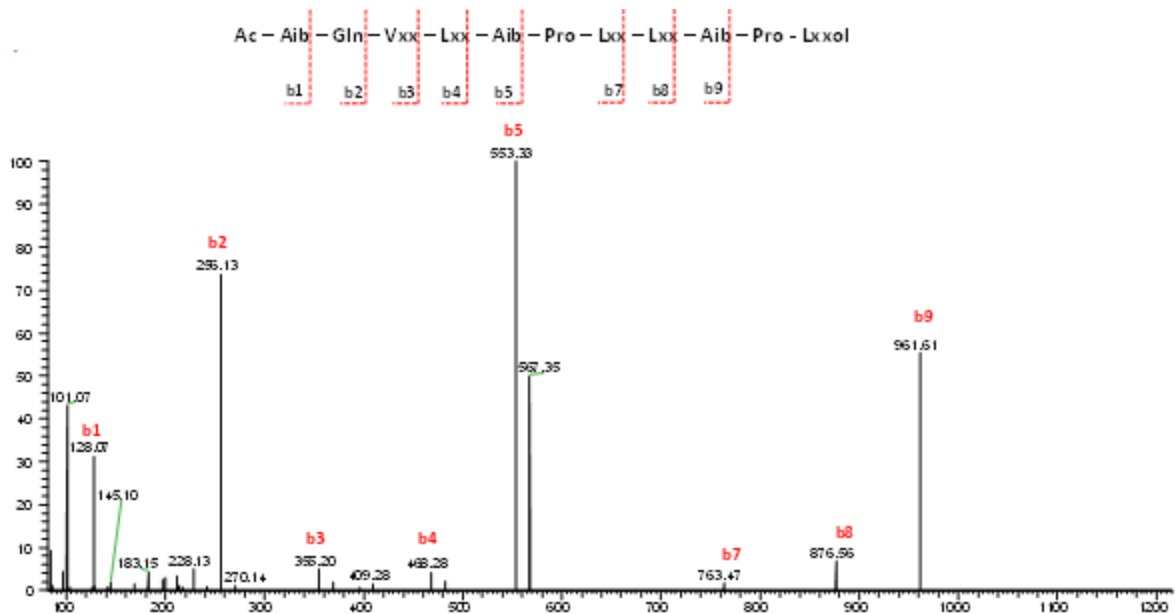


Figura 3. MS/MS do peptaibol hipomurocina A3.

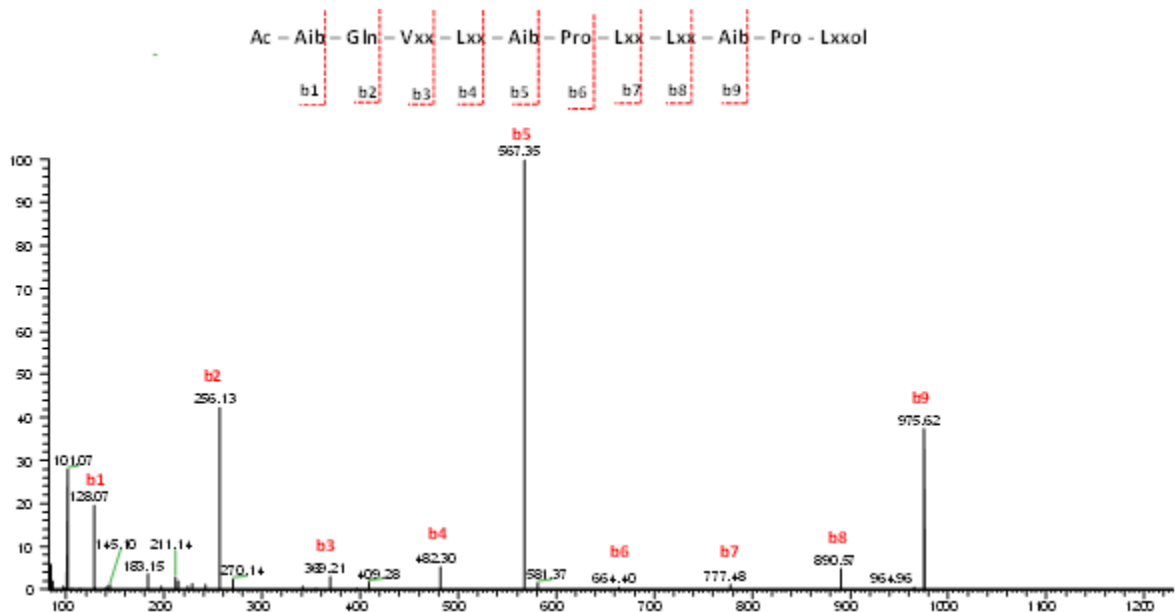


Figura 4. MS/MS do peptaibol hipomurocina A4.

*Trichoderma amazonicum* MMSRG 38A é um produtor de peptaibols de 11 resíduo da série das hipomurocinas que apresentam atividades antibióticas, anti-helmínticas e citotóxicas como as hypomurocins A e B (Becker et al. 1997; Ayers et al. 2012). A literatura relata o grande potencial de espécies de *Trichoderma* em produzir de peptaibols de 11, 14 e 18 resíduos.

## Conclusões

A avaliação do perfil metabólico por espectrometria de massas do isolado *T. amazonicum* MMSRG38A indicou a presença de moléculas conhecidas, como as hipomurocinas A3 e A4, e a presença de moléculas cujas estruturas ainda permanecem desconhecidas, como os íons 1220 e 1264. Esses resultados reforçam a necessidade de buscar novos metabólitos de diferentes biomas brasileiros para fornecer novas entidades químicas que possam ser úteis na medicina e na agricultura.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo suporte financeiro e concessão de bolsas de estudo obtido a partir do programa Biodiversa (Edital Nº 007/2021). Ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES-Procad AmazonMicro e CAPES-Amazônia Legal.

## Referências

- Ali, S.; Khan, M.J.; Anjum, M.M.; Khan, G.R.; Ali, N. 2022. *Trichoderma harzianum* modulates phosphate and micronutrient solubilization in the rhizosphere. *Gesunde Pflanzen* 1-10.
- Almeida, F.B.D.R.; Cerqueira, F.M.; Silva, R.D.N.; Ulhoa, C.J.; Lima, A. L. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters* 29(8): 1189-1193.
- Atanasova, L.; Crom, S.L.; Gruber, S.; Couplier, F.; Seidl-Seiboth, V.; Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14(1): 1-15.
- Ayers, S.; Ehrmann, B.M.; Adcock, A.F.; Kroll, D.J.; Carcache de Blanco, E.J.; Shen, Q.; Oberlies, N.H. 2012. Peptaibols from two unidentified fungi of the order Hypocreales with cytotoxic, antibiotic, and anthelmintic activities. *Journal of Peptide Science* 18(8): 500-510.
- Becker, D.; Kiess, M.; Brückner, H. 1997. Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A and B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Liebigs Annalen* 1997(4): 767-772.
- Chaverri, P.; Samuels, G.J. 2013. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution* 67(10): 2823-2837.

Daniel, J.F.D.S.; Rodrigues Filho, E. 2007. Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Product Reports* 24(5): 1128-1141.

Druzhinina, I.S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B.A.; Kenerley, C.M.; Monte, E.; Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9(10): 749-759.

Druzhinina, I.S.; Shelest, E.; Kubicek, C.P. 2012. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters* 337(1): 1-9.

Jaklitsch, W.M. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology* 63: 1-91.

Matarusu, A.B. 2022. Efektivitas *Trichoderma Amazonicum* dan plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) akar bambu untuk pengendalian penyakit moler padatanaman bawang merah lembah palu (*Allium Wakegi* X Araki). Tese de Doutorado. Universitas Tadulako, Indonésia.

Mukherjee, A.; Venkataraman, V.; Liu, B.; Glance, N. 2013. What yelp fake review filter might be doing? In: *Proceedings of the international AAAI conference on web and social media* 7(1): 409-418.

Pamphile, J.A.; Costa, A.T.; Rosseto, P.; Polonio, J.C.; Pereira, J.O.; Azevedo, J.L. 2017. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. *Revista Uningá* 53(1): 113-119.

Peixoto, P.A.N.S.; De Azevedo, J.L.; Caetano, L.C. 2004. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* 3(4): 69-72.

Poveda, J. 2021. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biological Control* 159: 104634.

Ramada, M.H.S.; Lopes, F.A.C.; Ulhoa, C.J. 2019. *Trichoderma*: metabólitos secundários. In: Meyer, M.C.; Mazaro, S.M.; Silva, J.C. *Trichoderma*: Uso na Agricultura. Embrapa, Brasília. p.201-218.

Rana, K.L.; Kour, D.; Sheikh, I.; Yadav, N.; Yadav, A.N.; Kumar, V.; Singh, B.P.; Dahaliwal, H.S.; Saxena, A.K. 2019. Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications. In: Singh, B. (eds). *Advances in Endophytic Fungal Research*. Springer, Cham. p.105-144.

Rivera-Chávez, J.; Raja, H.A.; Graf, T.N.; Gallagher, J.M.; Metri, P.; Xue, D.; Oberlies, N.H. 2017. Prelamethicin F50 and related peptaibols from *Trichoderma arundinaceum*: validation of their authenticity via in situ chemical analysis. *RSC Advances* 7(72): 45733-45741.

Ruano-Rosa, D.; Prieto, P.; Rincón, A.M.; Gómez-Rodríguez, M.V.; Valderrama, R.; Barroso, J.B.; Mercado-Blanco, J. 2016. Fate of *Trichoderma harzianum* in



the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *BioControl* 61(3):269-282.

Samuels, G.J. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96(2):195-206.

Sood, M.; Kapoor, D.; Kumar, V.; Sheteiw, M.S.; Ramakrishnan, M.; Landi, M.; Sharma, A. 2020. *Trichoderma*: The "secrets" of a multitalented biocontrol agent. *Plants* 9(6): 762.

Souza, A.Q.L.D.; Souza, A.D.L.D.; Astolfi Filho, S.; Pinheiro, M.L.B.; Sarquis, M.I.D.M.; Pereira, J.O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnoscogens bentham*. *Acta Amazônica* 34: 185-195.

Tameswari, N.L. 2016. Karakterisasi kitinase kasar dari *Trichoderma amazonicum* (P. Chaverri & Gazis 2011) LP3= Characterization of crude chitinase from *Trichoderma amazonicum* (P. Chaverri & Gazis 2011) LP3. Universitas Indonesia Library. Abstrak. (<https://lib.ui.ac.id/detail?id=20422200&lokasi=lokal>).

Zhang, C.L.; Liu, S.P.; Lin, F.C.; Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. 2007. *Trichoderma taxi* sp. nov., an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters* 270(1): 90-96.