



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTAIBOLS
PRODUZIDOS POR LINHAGEM DE *Trichoderma asperellum***

JOÃO PAULO CABRAL DE BRITO

GOIÂNIA

2014

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTAIBOLS PRODUZIDOS POR LINHAGEM DE *Trichodermaasperellum*

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia. Área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profº. Dr. Cirano José Ulhoa

GOIÂNIA

2014

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTAIBOLS
PRODUZIDOS POR LINHAGEM DE *Trichodermaasperellum***

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro

Universidade Estadual de Goiás

Prof. Dra. Kátia Flavia Fernandes

Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: 08 / 08 / 2014

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo que sou, que tenho, e que ainda serei e terei. Por ter amado incondicionalmente alguém tão falho e teimoso como eu, e ainda ter me dado a oportunidade de conhecer pessoas incríveis. Nem em toda uma vida será possível Te agradecer o que até aqui o Senhor já fez.

Agradeço minha família por ser meu cais nessa jornada. A meus pais por terem me ensinado valores que tornaram meu caráter sólido, e ao meu irmão pela companhia sempre! À minha irmã de coração Elisa pelo bom humor inigualável, e aos meus sobrinhos Joshua e Matthew pelas tantas risadas e perguntas do tipo: *óio, porque você só estuda?* (Sabe de nada inocente!).

Agradeço ao laboratório de Enzimologia por ser o melhor lugar onde eu poderia ter passado esses anos! Ao Angel, Pabline, Kênia, Rogério e Gabi pelo prazer de ter vocês como sendo mais que meros colegas, mas verdadeiros amigos! À Raphaela, Vanessinha, Juliana, Paulo, Morgana, Bianca e Amanda pela companhia divertida a cada experimento. E à Val e Marcela, pelo número infinito de idéias, puxões de orelha, risadas (com direito a dores abdominais), asinhas de frango (com pimenta, por favor) e claro, Chocolate Thunder!

Aos meus grandes amigos candango-goianienses que me suportaram em Brasília por meses! Ao Andrei (o *óteacher* o *ódoctor* o *ócara*) por ser um amigo ímpar, com dotes culinários invejáveis, humor ácido e um coração enorme. À dupla mais que dinâmica Fabyano e Amanda Rafaela! Vocês são incríveis! Agradeço por cada conversa séria (ou não), idéias, fotos e pela amizade tão verdadeira construída durante esses anos! E ao Marcelo, um co-orientador exímio e amigo fantástico, do qual nenhum adjetivo que eu usasse aqui seria capaz de expressar a gratidão que sinto. Agradeço por ter dedicado parte do seu tempo pra colocar minhas idéias no eixo, abrir meus olhos para o que eu não via, e por ter me acrescentado muito, profissional e pessoalmente.

Aos amigos do meu (quase segundo) laboratório vizinho, Aline, Marina e (R)Elaine. Ao James e ao Zé pela grande ajuda. Aos meus amigos *óhermanos* (M)Alonso, Andres e William, com os quais eu aprendi que dizer *óbueno* não é tão bom quanto parece, que conhecer novas culturas é melhor do que se imagina, e que grandes amigos não tem fronteiras! Ao Paulo e a Lara, que

entamente, já os considero mais que colegas!
Mariana, que há seis anos mantém inabalável uma
amizade que atravessou graduação e pós. Entre picos e vales (se é que me
entende) nós rimos, estressamos, conversamos e cozinhamos (nesse caso,
você). Sou grato pela sua companhia infalível, e que outros seis anos tão bons
quanto os que passaram venham pela frente!

Agradeço ao professor Cirano por ter sido um exemplo de integridade e
ponderação que vai além da Academia. Ao Professor Luciano Paulino pela
incontestável contribuição, e aos colegas que fiz na Embrapa-Cenargen. A
Mariana Quezado, uma co-orientadora de alto calibre, que foi fundamental para
o início deste projeto, e que também me ensinou muito mais do que espectros
de massa! Ao programa de Pós Graduação em Biologia, ao ICB e à
Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade única de me conceder
ferramentas capazes de transformar a sociedade.

À todos que direta ou indiretamente estiveram comigo nessa caminhada
meu muito obrigado!



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

*¶Eu] Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas
parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.ô*

C. S. Lewis

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Trichoderma</i> spp.	1
1.2 Peptaibols.....	4
2. OBJETIVOS.....	11
3. METODOLOGIA.....	12
3.1 Manutenção dos isolados e produção de esporos	12
3.2 Condições de cultivo	12
3.3 Extração	12
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	13
3.5 Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF)	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Cromatografia.....	14
4.2 Fração 2	15
4.3 Fração 3	18
4.4 Fração 4	20
4.5 Fração 5	23
4.6 Fração 6	24
4.7 Fração 7	27
4.8 Fração 8	29
4.9 Fração 9	30
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33



Ac	Acetil
ACB	Agente de Controle Biológico
AcN	Acetonitrila
Aib (U)	Ű-aminoisobutirato
Ala (A)	Alanina
Cys (C)	Cisteína
ESI	Electrospray
EtNor	Etilnorvalina
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido Glutâmico
Gly (G)	Glicina
Hyp	Hidróxirolina
Ile (I)	Isoleucina
Iva (J)	Isovalina
Leu (L)	Leucina
Lxx	Leucina ou Isoleucina
<i>m/z</i>	Razão entre massa e carga
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MeHa	Ácido (4S, 2E)-4-metilex-2-enóico
nm	Nanômetro
Phe (F)	Felinalanina
Pro (P)	Prolina
Ser (S)	Serina
TFA	Ácido Trifluoroacético
Thr (T)	Treonina
TOF	Time-of-Flight
Val (V)	Valina
Vxx	Valina ou Isovalina

Figura 1. Estrutura de aminoácidos não proteinogênicos encontrados em peptaibióticos.....	5
Figura 2. Estrutura de aminoácidos modificados (amino álcoois) encontrados na extremidade C-terminal de peptaibols.	6
Figura 3. Vista lateral e superior de um canal iônico voltagem dependente formado por um heptâmero de alameticinas, criando um poro de, segundo o autor, 9 Å (RAHAMAN & LAZARIDIS 2014).	8
Figura 4. Modelo das etapas necessárias para biossíntese de peptaibols em uma NRPS (SCHWARZER et al., 2003).	9
Figura 5. Esquema do modo de ionização por electrospray (CANTÚ et al., 2008).....	10
Figura 6. Esquema do modo de ionização por MALDI (CANTÚ et al., 2008).....	11
Figura 7. Cromatografia por HPLC do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356. Detecção a 216 nm (em preto) e 280 nm (em vermelho). O gradiente de acetonitrila + TFA 0,1% está representada em azul.....	15
Figura 8. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 2 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	16
Figura 9. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 935,6 da fração 2, obtido por MALDI/TOF.....	16
Figura 10. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 953,6, da fração 2, obtido por MALDI/TOF.....	18
Figura 11. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 3 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	19
Figura 12. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 919,6 da fração 3, obtido por MALDI/TOF.....	19
Figura 13. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 937,7 da fração 3, obtido por MALDI/TOF.....	20
Figura 14. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 4 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	21
Figura 15. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1698,1 da fração 4, obtido por MALDI/TOF.....	21
Figura 16. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 612,4 da fração 4, obtido por MALDI/TOF.....	22
Figura 17. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 5 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	23
Figura 18. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1728,0 da fração 5, obtido por MALDI/TOF.....	24
Figura 19. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 6 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	25
Figura 20. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1712,0 da fração 6 obtido por MALDI/TOF.....	25

DI/TOF da fração 6 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356,	26
Figura 22. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 626,4 da fração 6, obtido por MALDI/TOF.....	26
Figura 23. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1728,0 da fração 6, obtido por MALDI/TOF.....	27
Figura 24. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 7 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	28
Figura 25. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1726,1 da fração 7, obtido por MALDI/TOF.....	28
Figura 26. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 8 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	29
Figura 27. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1726,1 da fração 8, obtido por MALDI/TOF.....	29
Figura 28. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 9 do extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.	30
Figura 29. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1740,2 da fração 9, obtido por MALDI/TOF.....	30
 Tabela 1. Sequência dos peptaibols encontrados no extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.....	31
Tabela 2. Informações adicionais dos peptaibols encontrados no extrato de <i>T. asperellum</i> TR356.....	31

RESUMO

O gênero *Trichoderma* corresponde a fungos filamentosos, de vida livre, que inclui espécies capazes de agir como agentes de controle biológicoeficazes contra fungos fitopatogênicos. Acredita-se que esta capacidade é devida a sinergia de vários mecanismos, incluindo a ampla variedade de metabólitos secundários produzidos por estes organismos. Dentre eles, há a produção de peptídeos antibióticos conhecidos como ópeptaibolsô compostos caracterizados pela presença de aminoácidos não proteinogênicos como Û-aminoisobutirato (Aib), e por possuírem modificações N-terminais e presença de amino álcoois na região C-terminal. Estes peptaibols apresentam natureza anfipática, permitindo a formação de canais iônicos nas membranas lipídicas, o que se acredita estar relacionado com sua atividade antimicrobiana. Este trabalhoteve como objetivo traçar um perfil de produção e identificar peptaibols secretados pela linhagem de *Trichoderma asperellum* TR356. O isolado foi crescido em meio TLE contendo 0,3% de glicose, por 5 dias, 120 rpm no escuro. O sobrenadante filtrado foi utilizado como fonte para extração de metabólitos. Estes extratos foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e posterior análise pela técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF). Os resultados indicam a produção de duas classes de peptaibols por esta linhagem de *T. asperellum*. Foram elucidadas as estruturas primárias de duas Asperelinas (A e E), e de cinco Trichotoxinas (T5D2, T5E, T5F, T5G e 1717A). A maior parte destes peptaibols havia sido descrito anteriormente em linhagens de *T. viride* e linhagens de *T. asperellum* marinhas. Este é o primeiro relato de alguns destes compostos sendo produzidos por uma linhagem de *T. asperellum* proveniente do solo. Futuras análises serão necessárias para a elucidação de suas estruturas tridimensionais e atividade destes compostos contra fitopatógenos.

Palavras-chave: *Trichoderma asperellum*, peptaibols, espectrometria de massa, asperelinas, trichotoxinas.

ABSTRACT

Trichoderma genus corresponds to free-living filamentous fungi, including species able to act as biological control agents against pathogenic fungi. It is believed that this ability is due to the synergy of several mechanisms, including a wide variety of secondary metabolites produced by these organisms. Among them, there is the production of peptaibols, an antibiotic peptide group characterized by the presence of non-proteinogenic amino acids such as β -aminoisobutyrate (Aib), presence of N-terminal modifications and amino alcohols in the C-terminal region. These peptaibols have amphipathic nature, allowing the formation of ion channels in lipid membranes, which are believed to be related to its antimicrobial activity. This study aimed to draw a profile of production and identify of secreted peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain. The fungi was grown in TLE with 0.3% glucose medium for 5 days, 120 rpm in the dark. Liquid medium filtrate was used as metabolites source. These extracts were subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) and subsequent analysis by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF). The results indicate the production of two classes of peptaibols for this *T. asperellum* strain. Primary structure of two Asperelins (A and E) and five Trichotoxins (T5D2, T5E, T5F, and T5G 1717A) has been elucidated. Most of these peptaibols had been previously described in *T. viride* and *T. asperellum* marine strains. This is the first report of some of these compounds being produced by a *T. asperellum* strain from soil. Future analysis will be necessary to elucidate the three-dimensional structures and their activity against pathogens.

Key words: *Trichoderma asperellum*, peptaibols, mass spectrometry, asperelins, trichotoxins.

1.1 *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* pertence ao Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae são fungos filamentosos, de vida livre, amplamente distribuídos na natureza (GAMS & BISSET, 1998). As espécies deste gênero podem ser reconhecidas por meio de características macroscópicas como crescimento rápido em cultura, rede micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e esparsa. A estrutura e tamanho dos conidióforos são utilizados para a diferenciação de espécies, podendo ser subglobosos, ovóides, elipsóides ou elíptico-cilíndricos, lisos ou ligeiramente rugosos, hialinos ou com coloração variando do amarelo ao verde-escuro (CORABI-ADELL, 2004; SCHUSTER and SCHMOLL, 2010).

Muitos são classificados como fungos imperfeitos, por não terem fase sexual conhecida. Em algumas espécies de *Trichoderma* a reprodução sexuada (fase teleomórfica) é conhecida, e faz parte do gênero *Hypocrea*. Dentre as espécies utilizadas no controle biológico, a maioria não se reproduz de forma sexuada (HARMAN et al., 2004). Os isolados de *Trichoderma* que não são encontrados associados com seus estágios sexuais são considerados fungos de reprodução clonal (mitóticos) (LIMA, 2002; SAMUELS, 2006).

Algumas espécies são consideradas cosmopolitas, característica que parece estar relacionada com sua capacidade metabólica diversificada (KUBICEK et al., 2008). Espécies como *T. longibrachiatum* são encontradas nas Américas do sul e do norte, Europa, África e Índia, enquanto *T. citrinoviride* é encontrado nas Américas, Europa, sul da Ásia e Austrália. Dentre as espécies mais conhecidas como cosmopolitas, temos *T. harzianum* e *T. asperellum* (BISSET et al., 2003; SAMUELS, 2006).

Já espécies como *T. polysporum* e *T. minutisporum*, por exemplo, são encontradas em regiões mais frias, assim como *T. aureoviride*, que parece estar limitado ao Reino Unido e Europa. Algumas espécies apresentam-se mais específicas, como *T. stromaticum*, que é encontrado apenas nas Américas e associado ao cacau (*Theobroma cacao*) (SAMUELS, et al., 2000).

características do gênero *Trichoderma* é sua capacidade de atuar como agente de controle biológico (ACBs) contra micro-organismos fitopatógenos. Métodos tradicionais para o controle desses fitopatógenos tem sido a aplicação de fungicidas químicos, porém o uso destes agentes causam impactos ambientais drásticos. Uma das maneiras mais promissoras de conseguir uma redução no uso desses compostos é a utilização de ACBs (ZIMAND *et al.* 1996; HOWELL, 2002; VERMA *et al.* 2007; SCHUSTER and SCHMOLL, 2010).

O potencial de espécies de *Trichoderma* como ACB foi inicialmente identificado na década de 30 (WEINDLING, 1932), e a partir daí a utilização comercial de *Trichoderma* como ACBs tem sido eficaz contra fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., entre outros. Em países como Estados Unidos, Índia, Israel, Nova Zelândia e Suécia já é uma alternativa promissora aos fungicidas químicos (ZIMAND *et al.* 1996; DE MEYER, *et al.* 1998; HOWELL, 2002; KUNIEDA-ALONSO, 2005; DELGADO *et al.* 2007; VERMA *et al.* 2007; SCHERM *et al.*, 2008). Também são usados para proteger os frutos e vegetais comercialmente importantes, tais como banana, maçã, morango, manga, batata, e tomate durante seu armazenamento pós-colheita (MORTUZA, 1999; OKIGBO and OIKEDIUGWU, 2000; THANGAVELU, *et al.* 2004).

A definição de controle biológico, segundo a Embrapa Meio Ambiente, é o manejo de inimigos naturais de pragas, com o objetivo de reduzir o nível populacional destas. Porém a proposta da introdução de um ACB deve ser sempre cuidadosamente analisada. Apesar de serem considerados uma melhor alternativa em relação à biodiversidade quando comparados aos agrotóxicos, a introdução de um ACB pode comprometer não só a espécie alvo, mas também outros organismos que estão relacionados a ela, levando a um efeito cascata e consequentemente a um desequilíbrio ecológico (Disponível em:

><http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=224&func=unid><.

Acesso em: 9 jun. 2014). Compreender então os mecanismos de um ACB envolvidos durante o processo de controle da doença é de suma importância, pois diversos trabalhos mostram que estes mecanismos são variados até

o gênero *Trichoderma*, e esta compreensão é otimizada e posteriormente aplicada.

Os mecanismos de controle biológico podem ser divididos em efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos incluem competição por nutrientes e espaço, produção de antibióticos voláteis e não voláteis, produção de enzimas hidrolíticas e parasitismo. No micoparasitismo, por exemplo, o *Trichoderma* inicialmente reconhece a parede celular de fitopatógeno e se liga a ela por seus carboidratos. Uma vez ligado, ele se enovela ao patógeno utilizando-se de estruturas denominadas apressório, penetrando na parede celular da hifa hospedeira. Em seguida, ocorre a secreção de enzimas hidrolíticas e outros compostos que degradam e desorganizam a parede celular do fungo hospedeiro, levando em seguida a um desequilíbrio osmótico, retração do plasma e da membrana e agregação do citoplasma (HARAN *et al.*, 1996; HARMAN, 2004; ALMEIDA *et al.* 2007; VINALE, *et al.* 2008b).

Já os efeitos indiretos incluem todos os aspectos que produzem mudanças morfológicas e bioquímicas na planta hospedeira, como tolerância ao estresse e indução de resistência a doenças causadas por fitopatógenos, disponibilização de nutrientes e conseqüentemente, crescimento da planta (VITERBO *et al.*, 2002; HARMAN *et al.*, 2004; HARMAN, 2006; VITERBO *et al.*, 2007; KÜÇÜK *et al.*, 2008; SCHERM *et al.*, 2008; VINALE *et al.*, 2008a; 2008b; OSBOURN, 2010; VINALE *et al.*, 2012a).

Acredita-se que a grande capacidade de micoparasitismo apresentada por espécies de *Trichoderma* também esteja relacionada com a ampla variedade de metabólitos secundários produzidos por estes organismos (O'BRIAN, 2011; MUKHERJEE, 2011; 2012). O termo metabólito secundário inclui uma ampla variedade de compostos que estão envolvidos em vias de sinalização, desenvolvimento e interação com outros organismos. Sabe-se que esta produção é variável entre as espécies do gênero e pode variar também dependendo da interação com diferentes fitopatógenos (VINALE *et al.*, 2009).

Dentre vários compostos produzidos por *Trichoderma* capazes de promover/regular o crescimento de plantas (VINALE *et al.*, 2012a), há análogos de auxina (HOYOS-CARVAJAL, 2009), moléculas com atividade antifúngica contra fitopatógenos (VINALE *et al.*, 2012b) e compostos que atuam como sideróforos (VINALE *et al.*, 2013). Algumas substâncias como a 6-pentil- β -

Trichoderma lignum, tem atividade reguladora no crescimento de fungos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, e é até mesmo utilizada como fonte de aroma de côco pela indústria alimentícia (CUTLER *et al.*, 1986; PARKER *et al.*, 1997; VINALE *et al.*, 2012a).

Dentre outros metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma spp.*, há também relatos e descrição de compostos como pironas, terpenóides, esteróides (REINO *et al.*, 2008), gliotoxinas, gliovirinas (PATRON *et al.*, 2007), e alguns peptídeos antibióticos, conhecidos como pépteaibolsô (DANIEL, 2007). A descoberta de peptídeos antibióticos produzidos por fungos tem despertado interesse pelo fato de ser uma possível alternativa contra fitopatógenos. Alguns destes peptídeos produzidos por *Trichoderma harzianum* já foram descritos inibindo a atividade de β -glucanas sintetases de *Botrytis cinerea*, impedindo a reconstrução da parede celular do hospedeiro durante o antagonismo com *Trichoderma* (LORITO *et al.* 1996).

1.2 Peptaibols

Quando Weindling (1932) iniciou seus trabalhos com *Trichoderma*, ele descreveu como a hifa de *Rhizoctonia solani* era envolvida, penetrada e degradada pelas hifas do *T. lignorum*. Mais tarde relatou que esta espécie produzia um princípio letal eficiente contra *R. solani* e *Sclerotinia americana*, e a nomeou de gliotoxina, sendo que posteriormente, descobriu-se que o isolado que produzia a gliotoxina não era *T. lignorum*, e sim *T. virens* (WEBSTER, 1964). A partir daí, muitos outros aspectos da interação entre *Trichoderma* e patógenos foram sendo descritos.

Em trabalhos posteriores Lumsden e colaboradores (1992) relacionaram a atividade de *T. virens* contra *Phytophthora ultimum* e *R. solani* à produção de gliotoxinas, e Wilhite e colaboradores (1994) relataram que cepas mutantes de *T. virens* que não produziam gliotoxina, eram menos eficazes no controle de doenças causadas por *Phytophthora*. Alguns anos depois, Howell (2002) levantou questões sobre o papel destes compostos no biocontrole. Em experimentos anteriores, o autor havia observado que cepas mutantes de *T. virens* incapazes de parasitar *R. solani*, mas que possuíam a biossíntese de antibióticos em

controlar o crescimento do fitopatógeno. Além disso, as cepas que não produziam antibióticos e cepas mutantes deficientes para ambas as características ainda assim mantinham níveis de controle da *R. solani* semelhantes ao de cepas parentais. Isto indicava que tanto o parasitismo quanto a biossíntese de antibióticos, não são, por si só, suficientes para o biocontrole, mas sim a combinação de vários mecanismos.

Estes peptídeos antibióticos então foram incluídos em uma classe de compostos denominada peptaibióticos. Eles são definidos como peptídeos derivados do metabolismo secundário de fungos, e variam de 4 a 21 resíduos de aminoácidos aproximadamente (STOPPACHER *et al.*, 2013). Suas principais características são a presença de aminoácidos não proteínogênicos, como β -aminoisobutirato (Aib), isovalina (Iva), etilnorvalina (EtNor) e hidroxiprolina (Hyp) (GORRES & RAINES, 2010) (Fig. 1).

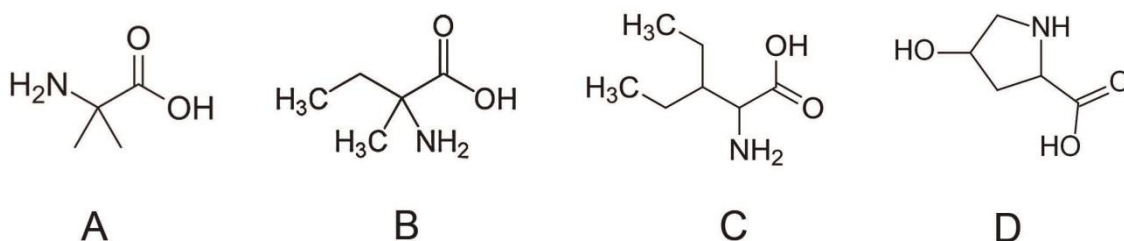


Figura 1. Estrutura de aminoácidos não proteínogênicos Aib (A), Iva (B), EtNor (C) e Hyp (D) encontrados em peptaibióticos.

O nome *peptaibol* é formado por **peptídeo**, **Aib** e amino álcool, fazendo referência às suas principais características (DANIEL, 2007; STOPPACHER *et al.*, 2013). Apresentam na extremidade N-terminal geralmente um grupo acil ou acetil, e na extremidade C-terminal uma hidroxila alcoólica, como fenilalaninol (Phe-OH, a), leucinol (Leu-OH, b), prolinol (Pro-OH, c) e valinol (Val-OH, d) (Fig. 2). Os peptaibols estão incluídos dentro da classe dos peptaibióticos, juntamente com compostos como lipopeptaibols (TONIOLO *et al.*, 2001) e lipoaminopeptídeos (DEGENKOLB *et al.*, 2003).

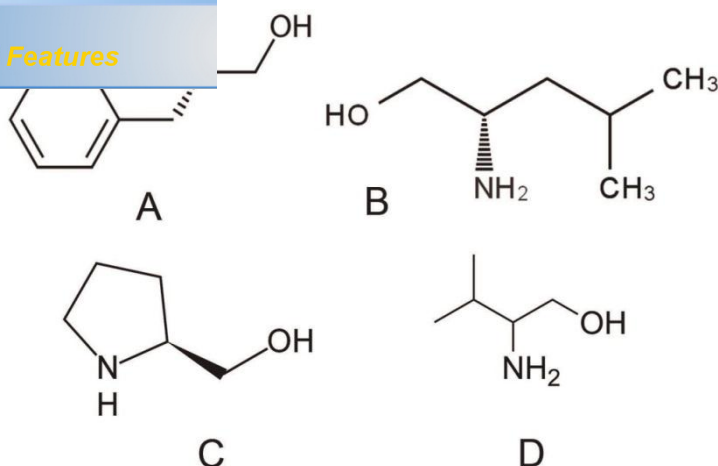


Figura 2. Estrutura de aminoácidos modificados (amino álcoois) encontrados na extremidade C-terminal de peptaibols.

O gênero *Trichoderma* é um dos principais produtores de peptaibols, tendo vários sido descritos na literatura. Diversos autores vem identificando peptaibols de *Trichoderma* ao longo dos anos, como por exemplo Rebuffat e colaboradores, que isolaram peptaibols de 19 resíduos de aminoácidos de *Trichoderma longibrachiatum* (1991), identificaram nove trichorzinas de dois isolados de *T. harzianum*, que variavam de 14 a 18 resíduos de aminoácidos (1995), e posteriormente analisaram sua biossíntese (1998). Além destes isolados, também se conhece peptaibols provenientes de linhagens de *T. asperellum* (CHUTRAKUL et al., 2008), *T. brevicompactum* (DEGENKOLB et al., 2008a), *T. longibrachiatum* (LECLERC et al., 2001), *T. citrinoviridae* (MADDAU et al., 2009), entre outros. Recentemente, foram descritos oito novos peptaibols de *T. atroviride* (PANIZEL et al., 2013) e identificadas novas aperelinas (G-Z₁₂) de *T. asperellum* (REN et al., 2013).

A informação sobre a estrutura de mais de 300 peptaibols foram reunidas pela primeira vez em um banco de dados, conhecido como Peptaibol Database (Disponível em: ><http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk/home.shtml><. Acesso em: 9 jun. 2014). Recentemente, Stoppacher e colaboradores (2013) criaram um programa denominado o The Comprehensive Peptaibiotics Database reunindo informações como a sequência de aminoácidos, fórmula molecular, massa monoisotópica, grupo pertencente e até o organismo de origem de 1043 peptaibióticos.

stos apresentarem atividade antimicrobiana, identificação e elucidação de suas estruturas.

Alguns estudos demonstraram a ação tóxica de peptaibols produzidos por isolados marinhos de *Trichoderma* até mesmo à embriões de moluscos bivalves (POIRIER *et al.*, 2007). Alguns isolados de *T. harzianum*, por exemplo, produzem um grupo de sete peptídeos antibióticos denominados trichorzininas (II e IV-IX) que apresentam estrutura helicoidal e atividade contra micoplasmas (DUVAL *et al.*, 1997; BÉVEN *et al.*, 1998), e dois grupos de harzianinas com 14 resíduos de aminoácidos, que apresentavam permeabilidade em membranas lipídicas e atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Sclerotium rolfsii* (REBUFFAT *et al.*, 1995).

Schirmböck e colaboradores (1994) identificaram duas trichorzianinas que eram produzidas na presença de parede de *Botrytis cinerea* e atuavam em sinergia com quitinases e β -1,3-glucanases para inibição do crescimento e esporulação do fitopatógeno, e posteriormente, Lorito e colaboradores (1996) observaram que estes mesmos peptaibols inibiam a atividade de β -1,3-glucanas sintetases de *Botrytis cinerea*. Alguns anos depois, foram isolados e identificados cinco peptaibols de 18 resíduos de aminoácidos de uma linhagem de *T. harzianum* que causavam alterações biológicas em células de carcinoma epitelial de pulmão humano (PELTOLA *et al.*, 2004). Recentemente em um estudo conduzido por Wang e colaboradores (2010), os autores observaram que um peptaibol denominado trichokonina IV (TKIV), secretado por *T. koningii*, inibiu o crescimento de células de carcinoma hepático causando o aumento do influxo de cálcio e consequente ativação de uma via de apoptose. Outros trabalhos tem aplicado o estudo destes peptaibols produzidos por *Trichoderma* na classificação e taxonomia do gênero (DEGENKOLB *et al.*, 2008b).

Alguns estudos sugerem que sua atividade biológica está relacionada com sua natureza anfipática, permitindo que esses compostos formem canais iônicos nas membranas lipídicas (LUCACIU *et al.*, 1997; BÉVEN, *et al.* 1998). Mikkola e colaboradores (2012) isolaram e identificaram dois peptaibols de *T. longibrachiatum* com 11 e 20 resíduos de aminoácidos, denominados de trilonginas, e que formavam canais de Na^+/K^+ voltagem dependentes em células espermáticas de javali. Os autores também observaram que os compostos quando juntos, atuavam em sinergia, formando canais de

que permaneciam abertos por mais tempo do
formados pelos peptaibols isoladamente.

Recentemente, Rahaman & Lazaridis (2014), simularam a dinâmica molecular de canais iônicos voltagem dependentes formados por alameticinas, um peptaibol de 20 resíduos de aminoácidos produzido por *T. viride*(Fig 3).

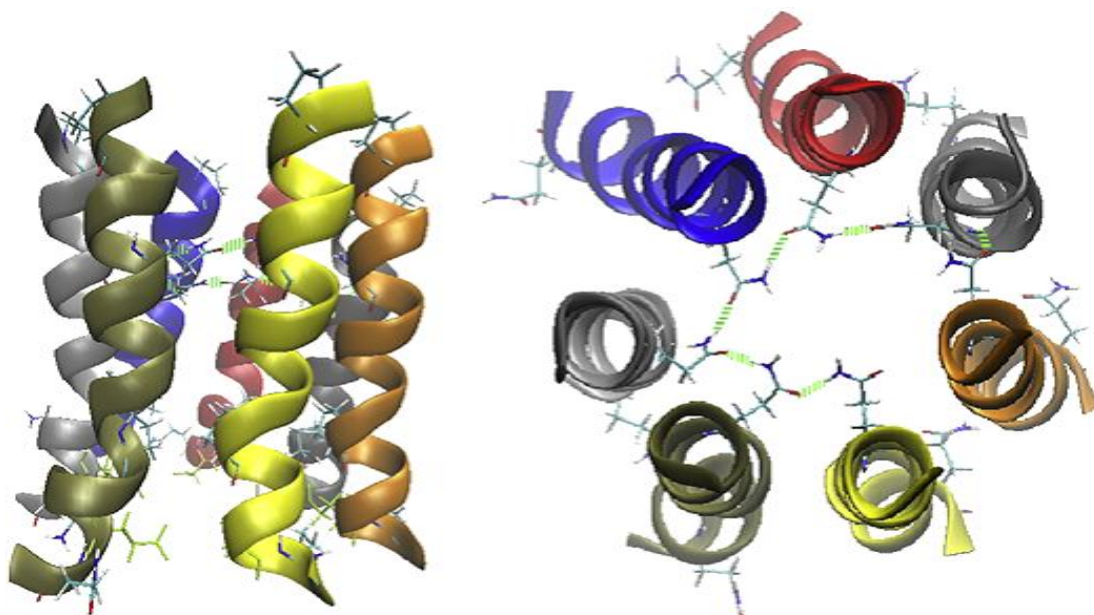


Figura 3. Vista lateral e superior de um canal iônico voltagem dependente formado por um heptâmero de alameticinas criando, segundo o autor, um poro de 9 Å (RAHAMAN & LAZARIDIS 2014).

Pela razão destes compostos apresentarem uma importância farmacológica, a investigação de sua biossíntese também tem sido alvo de estudos, já que a possibilidade de uma manipulação permitiria a criação de novas drogas(MOOTZ *et al.*, 2002). Os peptaibols se encaixam em um grupo de metabólitos denominado peptídeos não ribossomais. Isso se deve ao fato destes compostos não serem resultado de transcrição de um gene e sua subsequente tradução, mas são formados a partir de complexos multienzimáticos denominados Sintetases de Peptídeos Não-Ribossomais (NRPSs, sigla em inglês) (SCHWARZER *et al.*, 2003).

Em síntese, estes complexos multienzimáticos são formados por um conjunto de módulos, sendo que cada módulo possui domínios catalíticos responsáveis pelas etapas da síntese do produto final (SCHWARZER *et al.*, 2003). A especificidade destes domínios é variável. Alguns sítios de ligação parecem ser altamente conservados (STACHELHAUS *et al.*, 1999), enquanto

o para Aib, que parece aceitar Iva, Val e Ala, o
tura de peptídeos durante a biossíntese
(MUKHERJEE *et al.*, 2011; STOPPACHER *et al.*, 2013).

Apesar de haver variações, três domínios são comuns. O processo de biossíntese inicia-se com a entrada do aminoácido no domínio A (Adenilação), onde o aminoácido é ativado por adenilação. (Fig. 4a). No próximo domínio, denominado PCP (do inglês "Peptidyl Carrier Protein"), o aminoácido ativado é ligado a um cofator (HS-40PP) da proteína PCP, que funciona como um transportador entre os centros catalíticos (Fig. 4b). E por fim, no domínio C (Condensação), ocorre a ligação peptídica (Fig. 4c) (MAHARIEL & MOOTZ, 1997; MOOTZ *et al.*, 2002; SCHWARZER *et al.*, 2003).

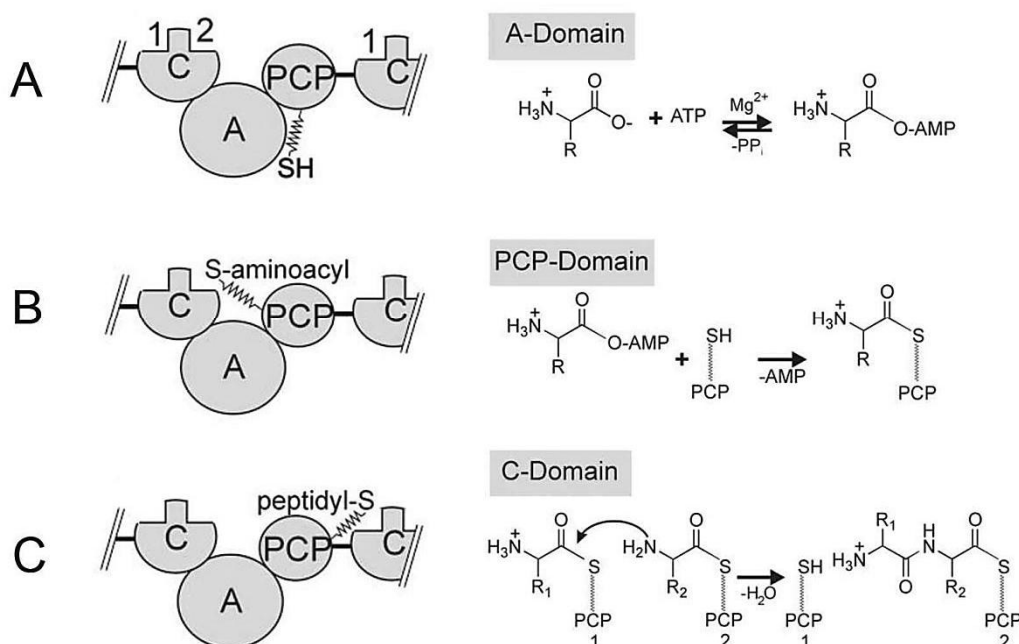


Figura 4. Modelo das etapas necessárias para biossíntese de peptaibols em uma NRPS (SCHWARZER *et al.*, 2003).

Para identificação e elucidação da estrutura destes metabólitos, diferentes métodos tem sido utilizados. A extração destes compostos tem sido feita a partir do meio após o crescimento de *Trichoderma spp.*, com aplicação de solventes orgânicos (como metanol, butanol e/ou acetato de etila), e seu isolamento e purificação através de técnicas cromatográficas. A identificação e análise tem sido realizadas principalmente por espectrometria de massa (DEGENKOLG *et al.*, 2003; DANIEL, 2007).

Essa é uma técnica analítica que permite analisar de proteínas, carboidratos, lipídeos, oligonucleotídeos, entre outras biomoléculas. Em resumo, a análise por espectrometria de massa baseia-se na geração de íons de compostos a partir de um método de ionização adequado. Os íons são separados por meio da sua relação massa-carga (m/z), e detectados por meio de um detector específico, sendo depois analisados e convertidos a partir de um processador de dados, gerando um espectro de massa (FERREIRA *et al.*, 2009).

Cada método de ionização possui um princípio distinto. Na ionização por *electrospray* por exemplo, a evaporação do solvente torna a repulsão eletrostática entre as espécies carregadas muito alta, levando a ocorrência de sucessivas explosões coulômbicas. Quando a tensão superficial da gota não pode mais suportar tantas cargas (limite de Rayleigh), ocorre a transferência (expulsão) dos íons para a fase gasosa (CANTÚ *et al.*, 2008) (Fig. 5).

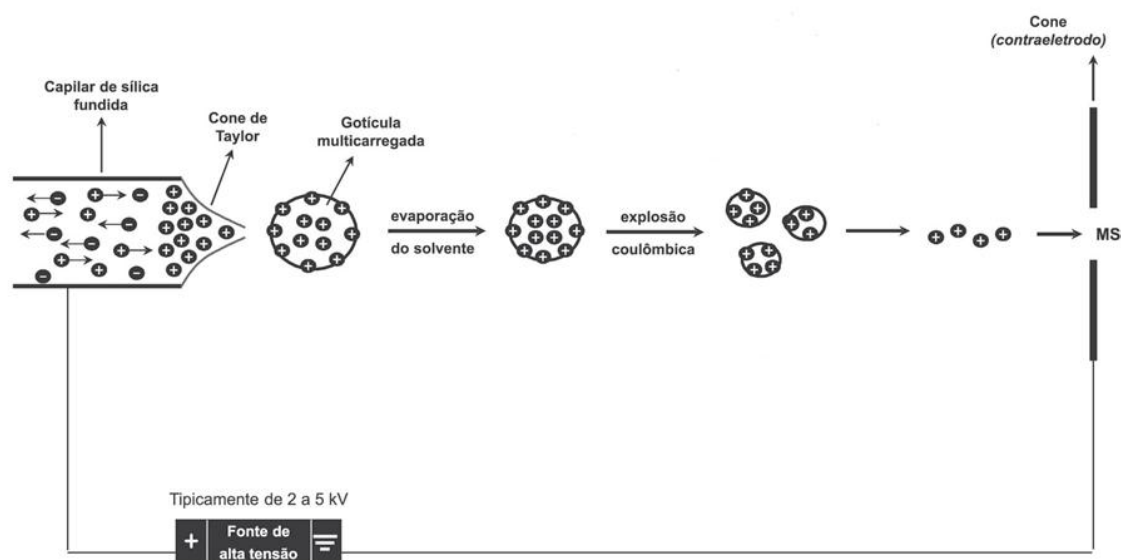


Figura 5. Esquema do modo de ionização por *electrospray* (CANTÚ *et al.*, 2008).

No método de ionização por MALDI, as proteínas são misturadas a um excesso de matriz, normalmente um ácido orgânico, de maneira que eles se cristalizem. Um feixe de laser é incidido sobre o cristal, fazendo com que a matriz absorva essa energia, induzindo a vaporização de parte da amostra. Com a vaporização e consequente ionização das moléculas, estas são transferidas eletrostaticamente para o espectrômetro de massa (CANTÚ *et al.*, 2008) (Fig 6).

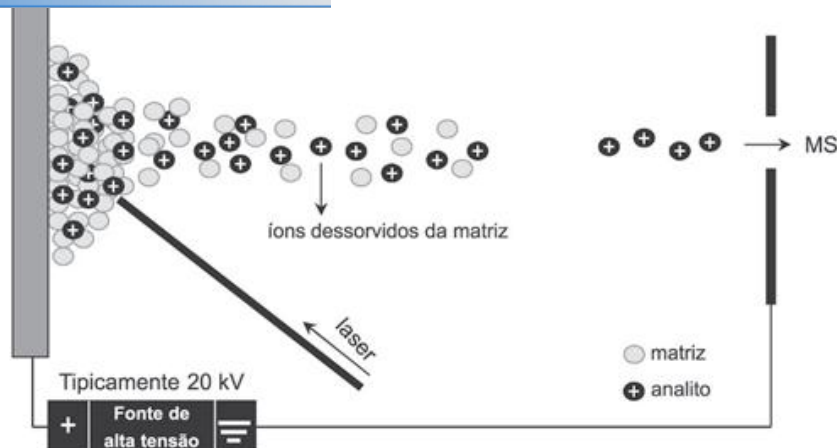


Figura 6. Esquema do modo de ionização por MALDI (CANTÚ et al., 2008).

A prospecção, o isolamento e a caracterização de peptaibols produzidos por espécies de *Trichoderma* spp. visam compreender melhor a produção destes compostos pelo gênero. A identificação destes compostos pode futuramente ajudar a elucidar processos envolvidos na biossíntese destas moléculas, nos mecanismos envolvidos no micoparasitismo, e até mesmo ser uma alternativa promissora no combate a fitopatógenos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi traçar um perfil de produção e identificar peptaibols secretados por *Trichoderma asperellum* TR356.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Fragmentar e identificar peptaibols produzidos pelo isolado selecionado utilizando técnicas de espectrometria de massa;
- Comparar a produção de peptaibols desta linhagem isolada no Brasil com outras linhagens descritas na literatura;
- Identificar, parcialmente, novos peptaibols e elucidar suas sequências.

3.1 Manutenção dos isolados e produção de esporos

A inoculação do isolado foi a partir de solução de esporos. Inicialmente, discos de 3 mm de diâmetro originados de placas de isolados de *Trichoderma asperellum* TR356 foram repicados periodicamente para novas placas de Petri contendo meio MYG [extrato de malte 5 g·L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g·L⁻¹, glicose 10 g·L⁻¹ e ágar 20 g·L⁻¹]. Após a esporulação do fungo, foi adicionado aproximadamente 4 mL de salina 0,9% (p/v). O sobrenadante coletado foi utilizado como fonte de esporos. A contagem dos esporos foi realizada visualmente com auxílio de um microscópio de luz em uma câmara de Neubauer. O isolado utilizado neste experimento foi cedido pela EMBRAPA-CNPAP e pela coleção do Laboratório de Enzimologia ICB/UFG.

3.2 Condições de cultivo

Foram adicionados aproximadamente 10⁷ esporos de *Trichoderma asperellum* em erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio TLE [0,3 g·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O; 2,0 g·L⁻¹ KH₂PO₄; 1,4 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,3 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0,3 g·L⁻¹ uréia; 1,0 g·L⁻¹ peptona; 0,1% (v/v) de solução elementos traços (Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺) e 0,3% (p/v) de glicose. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28°C e velocidade de 120 rpm no escuro por 5 dias (New Brunswick Cientific Shaker)

3.3 Extração

Após crescimento do fungo, o meio de cultura foi submetido à filtração a vácuo, utilizando bomba a vácuo (Primar), funil de Buchner, papel filtro e kitassato, separando o micélio do sobrenadante. A partir deste, os metabólitos de interesse foram extraídos com adição de acetato de etila (1:2). Após a separação das fases em um funil de separação, a fase apolar foi coletada, centrifugada e rotaevaporada. O resíduo formado foi ressuspenso através de

2) e posteriormente com acetonitrila, sendo a fração da acetonitrila foi liofilizada e utilizada como fonte de peptaibols.

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O material liofilizado foi ressuspendido em acetonitrila 5% + água (p/v) em concentração final de $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE/RF), em uma coluna analítica Vydac Protein & Peptide C18. Os eluentes foram água MiliQ com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA)(A) e acetonitrila com 0,1% de TFA(B), e fluxo de 1mL/min. O gradiente de concentração de B foi de 5% (v/v) durante 5 minutos, variou de 5% (v/v) a 95% (v/v) em 40 minutos e estabilizou em 95% (v/v) por mais 5 minutos. A detecção foi realizada a 216 e 280nm. Os picos observados foram coletados manualmente em microtubos com capacidade de 1,5mL. Para obtenção dos cromatogramas foi utilizado o programa Shimadzu Class VP.

3.5 Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF)

A análise por espectrometria de massa foi realizada em MALDI-TOF-TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) controlado pelo software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). As frações coletadas da CLAE foram misturadas com uma solução de matriz ácido 3-ciano-4-hidroxicinâmico, concentração de 10mg/mL, em uma razão 1:3 em uma placa MTP AnchorChip 400/384 maciça (Bruker Daltonics), e secadas a temperatura ambiente. A aquisição dos espectros de massa foi realizada na faixa de m/z entre 120 e 2500, no modo refletido positivo, com calibração externa (Protein Calibration Standard, Bruker). Os espectros de MS/MS dos peptaibols foram obtidos através da fragmentação via LIFT após análise dos espectros de MS obtidos e seleção de íons precursores para fragmentação. Para análise dos dados obtidos foi utilizado o software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). Estas etapas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa, CENARGEN/EMBRAPA, em Brasília, DF.

A escolha do isolado analisado, *T. asperellum*TR356, foi baseada em um trabalho recente conduzido por Geraldine e colaboradores (2013), que demonstraram que este isolado possuía alta eficiência no controle do mofo branco em campo, doença causada pelo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. No trabalho, os autores atribuem a eficiência no controle biológico deste isolado pela alta produção das enzimas hidrolíticas NAGase e α -1,3-glucanase, envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro. Porém, o envolvimento de outros metabólitos secundários, como produção de peptaibols, não foi analisado.

Apesar de se ter na literatura diversos peptaibols isolados e identificados a partir de linhagens de *T. asperellum*, a produção destes compostos entre as linhagens não é idêntica (CHUTRAKUL *et al.*, 2008; REN *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2013). Partindo desse contexto, percebeu-se a necessidade de investigar se o isolado *T. asperellum* TR356 produziria peptídeos pertencentes a esse grupo e quais seriam eles, já que esta linhagem foi isolada no Brasil.

4.1 Cromatografia

A partir do cromatograma do extrato de *T. asperellum*TR356, foram observadas 9 frações, detectadas a partir de 26,7 min (Fig. 7). Isto demonstra um aspecto hidrofóbico destes compostos, compartilhado pela maior parte dos peptaibióticos. As frações foram coletadas manualmente e analisadas em MALDI-TOF-TOF como descrito anteriormente. Na fração 1, o cromatograma apresenta um pico proeminente, tanto na detecção a 216nm, quando à 280nm. Porém, após análise por espectrometria de massa, não foram observados íons que correspondem a peptaibols, sendo provavelmente outros compostos protéicos e/ou pigmentos.

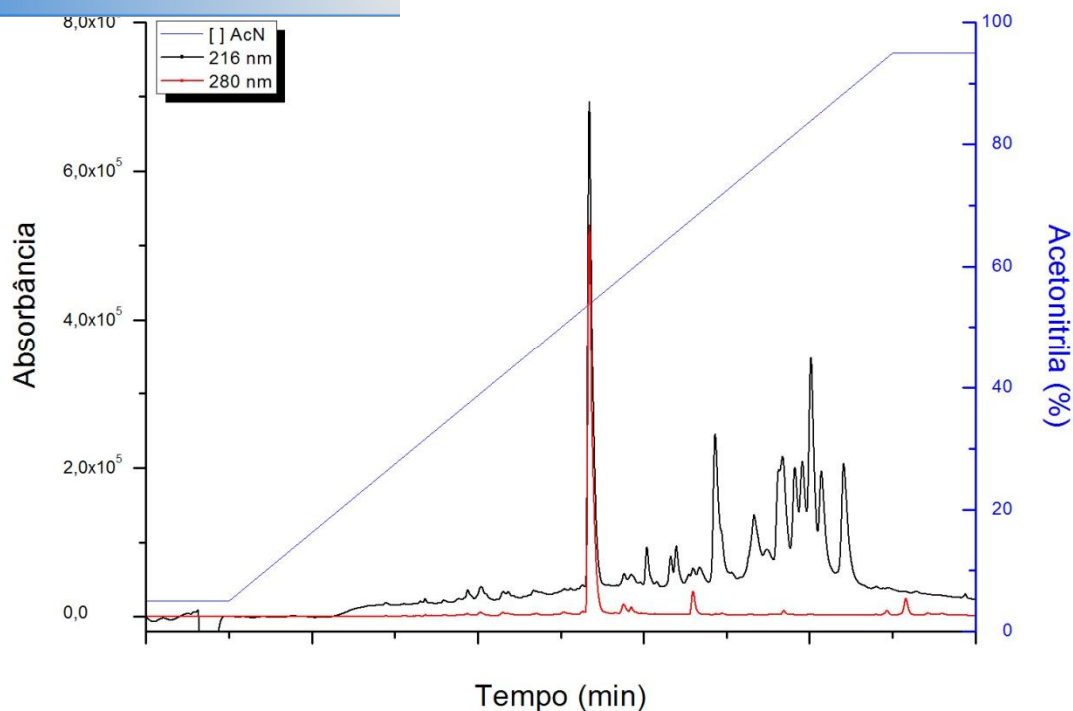


Figura 7. Cromatografia por HPLC do extrato de *T. asperellum* TR356. Detecção a 216 nm (em preto) e 280 nm (em vermelho). O gradiente de acetonitrila + TFA 0,1% está representada em azul.

4.2 Fração 2

A análise por espectrometria de massa da fração 2 demonstrou a presença de diversos íons, sendo os íons com m/z 935,6 $[M+H]^+$, 953,6 $[M+H]^+$, 975,5 $[M+Na]^+$ e 991,5 $[M+K]^+$ os mais proeminentes (Fig. 8). A interpretação do espectro de massa destes dois últimos não foi possível.

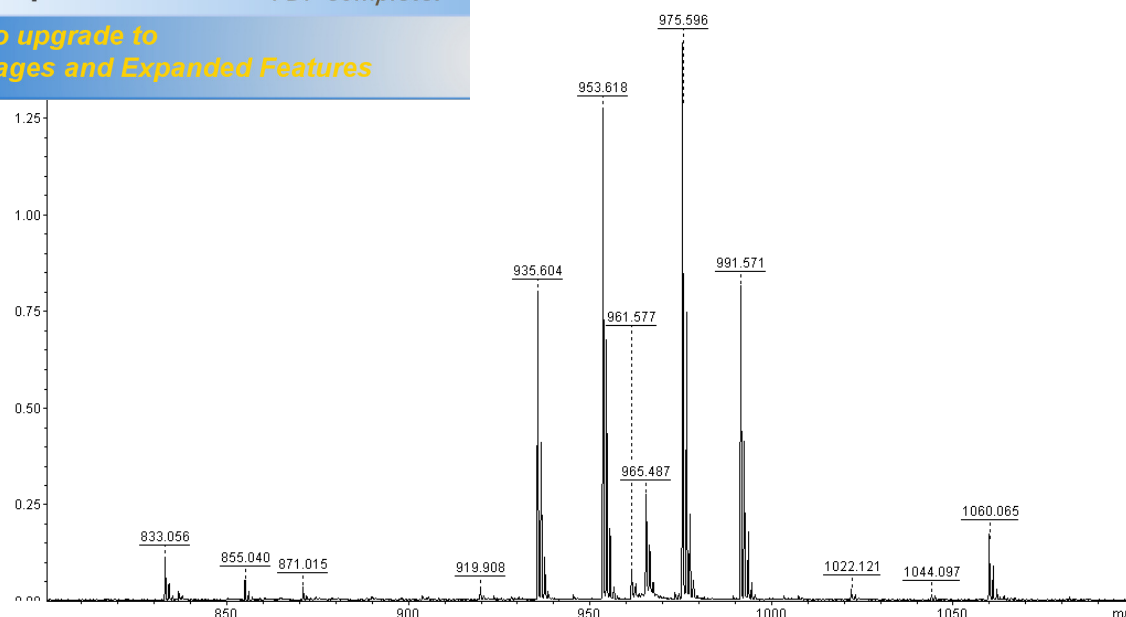


Figura 8. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 2 do extrato de *T. asperellum* TR356.

A partir da análise do íon m/z 935,6 $[M+H]^+$ observou-se uma sequência parcial (Thr ã Val ã Aib ã Lxx ã Aib ã Aib)correspondente à série - *b*(Fig. 9).

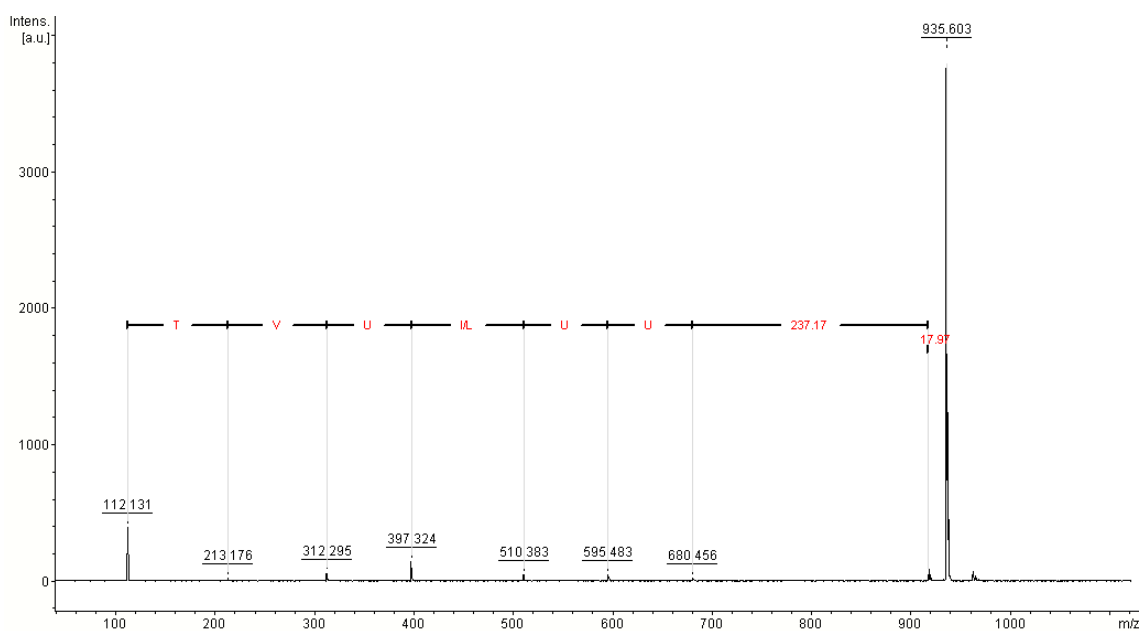


Figura 9. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 935,6 da fração 2, obtido por MALDI/TOF.

Na extremidade N-terminal a diferença de 112 Da sugere a presença de um ácido piroglutâmico ou um MeHa [ácido (4S, 2E)-4-metilex-2-enóico] , um ácido graxo presente em algumas classes de peptaibols. Apesar de ambas não

em peptaibols, Isogai e colaboradores (1992) descreveram lipopeptaibols denominado leucinostatinas, produzidas por *Paecilomyces spp*, um gênero de fungos nematófagos. Estes lipopeptaibols possuíam a adição de MeHa à uma prolina na extremidade N-terminal. Porém não há relatos deste tipo de modificação em *Trichoderma*. Já a presença de ácido piroglutâmico em peptaibols foi descrita apenas uma vez (PSUREK et al., 2006), produzidos por uma linhagem de *Trichoderma viride*. Estes peptaibols foram identificados como alameticinas F30 (ALM F30).

Na extremidade C-terminal a diferença de 237 Da sugere a presença de duas prolinas e uma glicina, sendo um destes um amino álcool (acarretando a perda de -14 Da correspondente a remoção de um oxigênio do ácido carboxílico e consequente adição de dois hidrogênios). Como não há na literatura ou em bancos de dados nenhum peptaibiótico que corresponda a estas características e que tenha sequência semelhante à encontrada nesta análise, acredita-se ser um novo peptaibol. Porém, é necessária melhor análise para confirmação destes dados.

Na análise do íon de m/z 953,6 $[M+H^+]$ podemos observar uma sequência parcial de cinco aminoácidos (Val ã Aib ã Lxx ã Aib ã Aib) referentes à série -b e uma diferença de 213 Da na porção N-terminal, e de 273 Da na porção C-terminal. Diferente do íon anterior, não se observa um resíduo de treonina antes da valina (Fig. 10).

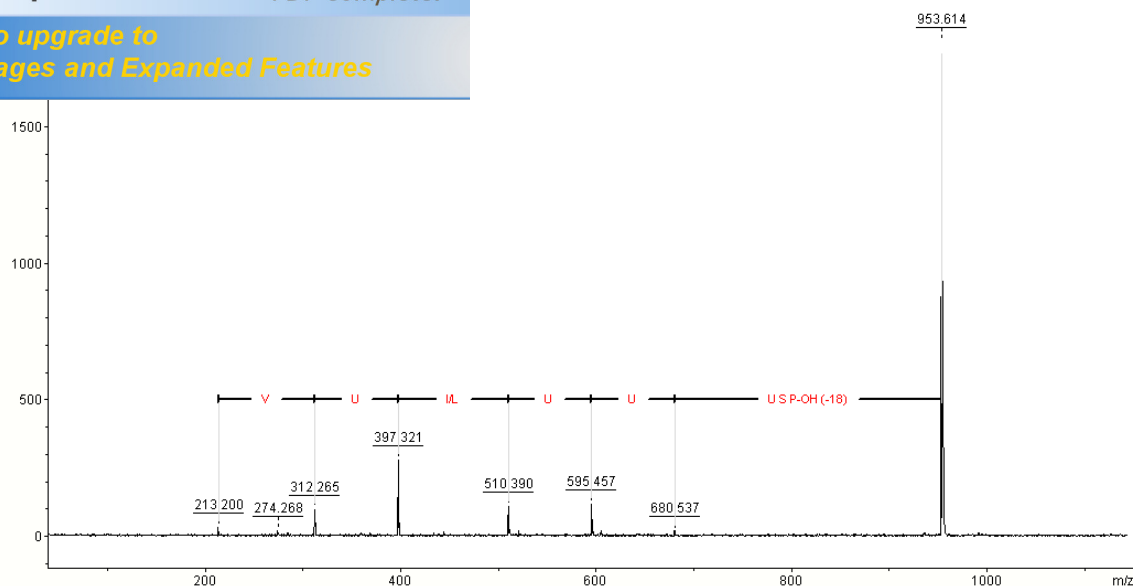


Figura 10. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 953,6, da fração 2, obtido por MALDI/TOF.

Na literatura e em bancos de dados, foi possível encontrar um íon com m/z 952,6 identificado como uma asperelina **E** (REN *et al.*, 2009). Partindo desta referência pressupõe-se então que a diferença de 213 Da observadas neste espectro seja referente a dois resíduos de Aib, sendo um deles acrescido de um acetil. Da mesma forma, a diferença de 273 Da corresponderia aos resíduos de Aib, serina e prolinol, além da diferença de 18 Da referente à perda de uma molécula de água. O grupo das asperelinas foi encontrado apenas em linhagens de *Trichoderma asperellum* marinhas (REN *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2013). Esta parece ser a primeira descrição deste composto sendo produzido por uma linhagem de *Trichoderma asperellum* terrestre.

4.3 Fração 3

Na análise da fração 3, os íons mais proeminentes possuem m/z de 919,6 [$M+H^+$]; 937,6 [$M+H^+$]; 959,6 [$M+Na^+$] e 975,5 [$M+K^+$] (Fig. 11). Assim como na fração anterior, a interpretação do espectro de massa dos dois últimos íons não foi possível.

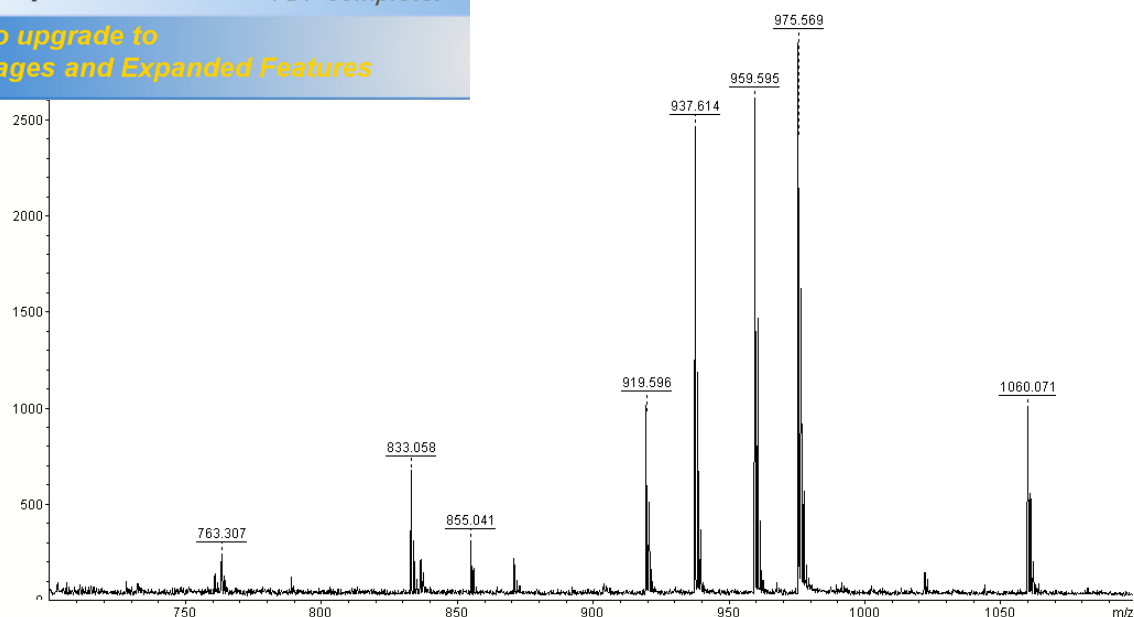


Figura 11. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 3 do extrato de *T. asperellum* TR356.

O íon de m/z 919,6 $[M+H]^+$ após análise apresentou sequência parcial (Thr ã Val ã Aib ã Lxx ã Aib ã Aib ã Ala ã Thr-OH) e diferença de 112 Da na porção N-terminal (Fig. 12). Assim como na fração anterior, esta sequência não parece semelhante com nenhuma outra descrita nos bancos de dados, e esta diferença de 112 Da pode corresponder a um ácido piroglutâmico ou um MeHa. Uma melhor análise é necessária para elucidação deste peptaíbol.

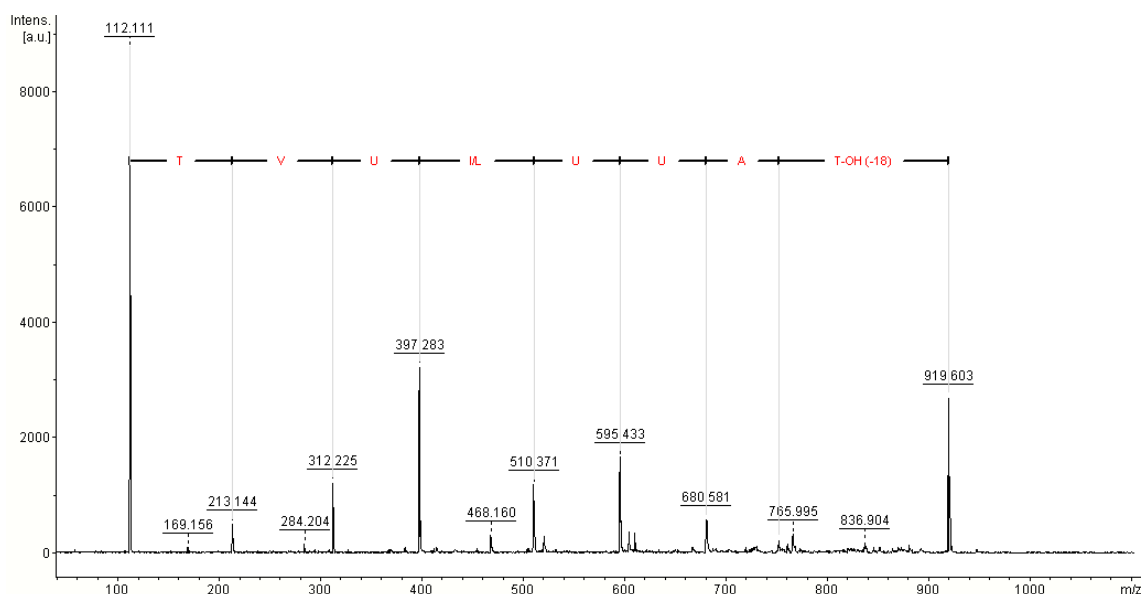


Figura 12. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 919,6 da fração 3, obtido por MALDI/TOF.

m/z de 937,7 $[M+H^+]$, é possível observar
xx ã Aib ã Aib) (Fig.13) como no íon de m/z
953,5 $[M+H^+]$ na fração anterior. A análise também mostra diferença de 213 Da
na porção N-terminal e de 257 Da na porção C-terminal.

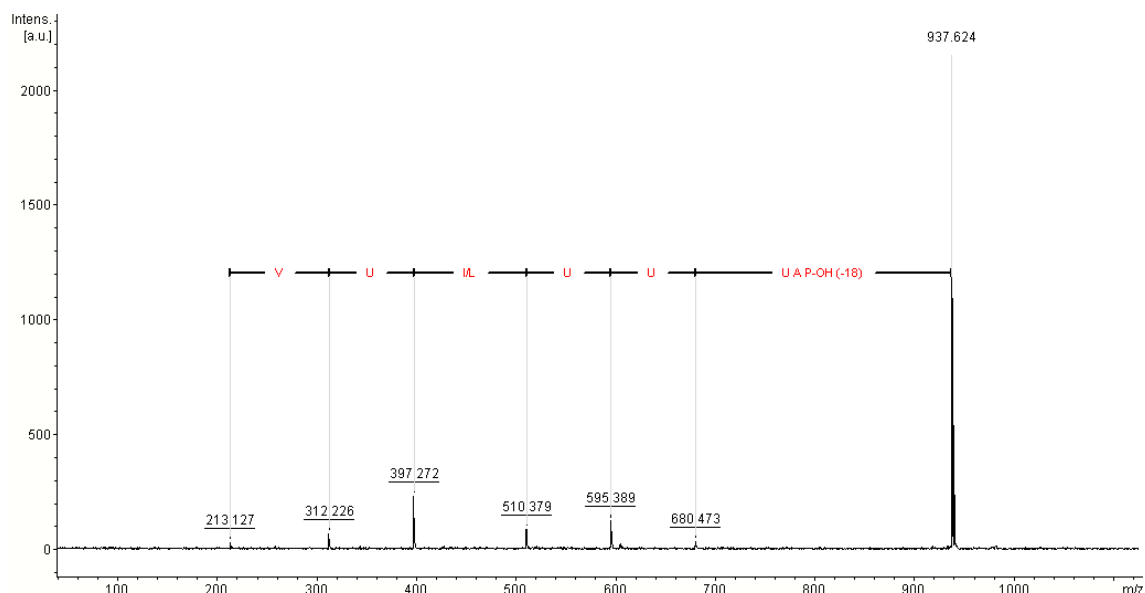


Figura 13. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 937,7 da fração 3, obtido por MALDI/TOF.

A partir de banco de dados, foi possível observar que a asperelina **A**, também descrita por Ren e colaboradores (2009), tem massa semelhante (936,6 Da), o que sugere a presença deste composto nesta fração. Novamente partindo desta referência, pressupõe-se então que a diferença de 213 Da corresponda à dois resíduos de Aib, sendo um deles acrescido de um acetil, e a diferença de 257 Da na porção C-terminal parece ser referente à alanina, Aib e prolinol (e 18 Da da molécula de água). A asperelina A também foi isolada apenas de linhagens de *Trichoderma asperellum* marinhas, e sua produção por linhagens terrestres ainda não foi descrita.

4.4 Fração 4

Nesta fração, a análise permitiu identificar alguns íons com m/z na faixa de 1700 (Fig. 14). Porém destes, apenas o íon com m/z 1698,1 $[M+Na^+]$ foi passível de interpretação.

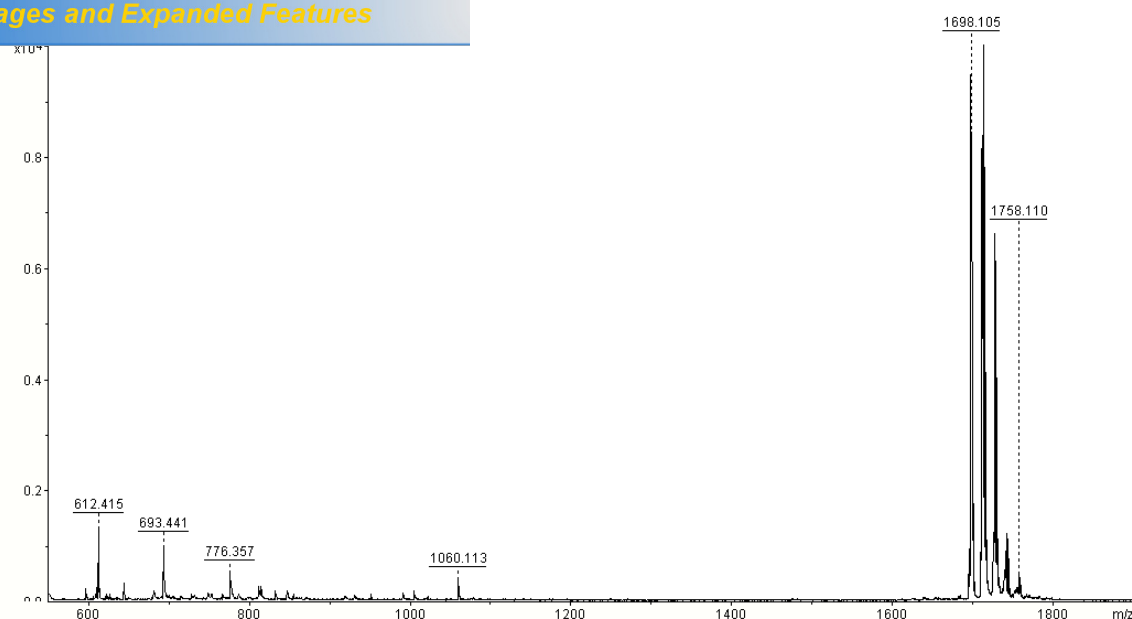


Figura 14. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 4 do extrato de *T. asperellum* TR356.

A partir da fragmentação deste íon (Fig 15), foi possível observar parte da série $\tilde{n}y$ (acima) e a maior parte da série $\tilde{n}b$ (abaixo).

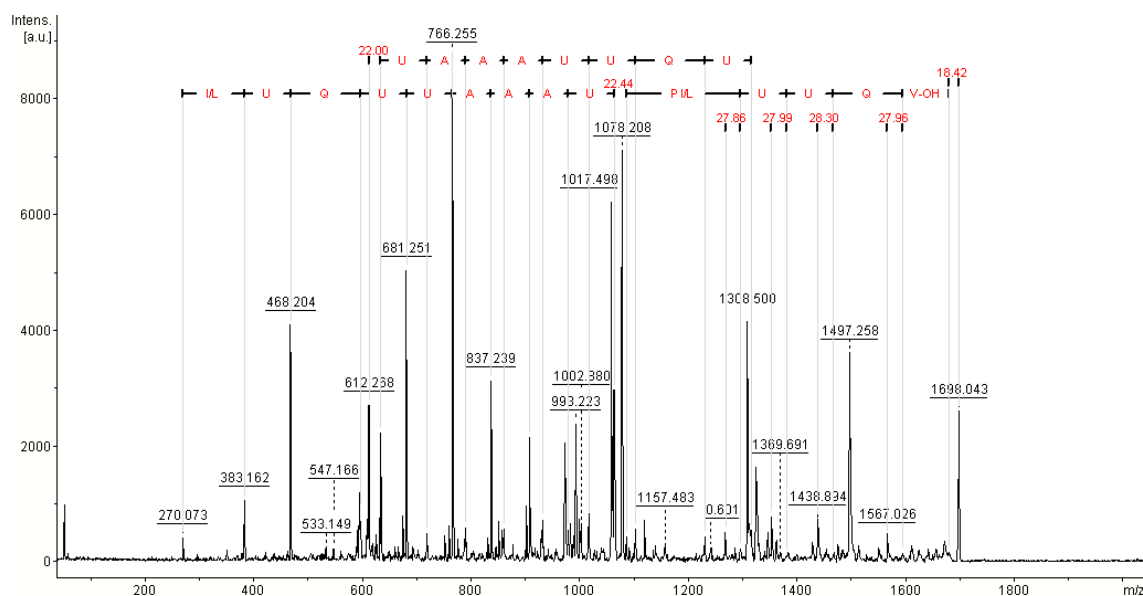


Figura 15. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1698,1 da fração 4, obtido por MALDI/TOF.

Na porção N-terminal da série $\tilde{n}b$ há uma diferença de 270 Da, e entre o Aib e a prolina, há um íon de sódio, também observado na série $\tilde{n}y$. Na porção C-terminal da série $\tilde{n}y$ é possível interpretar até o íon de m/z 612. Jaworski

trichotoxinas de *T. viride* notaram quão lábil a nestes peptaibols, o que gerava dois íons

resultantes desta quebra. Esta característica explicaria a ligação dos íons de sódio nesta exata posição em ambas as séries, e a presença do íon de m/z 612, que pode ser observado também no espectro da fração 4. Após fragmentado, este íon parece confirmar o que havia sido observado na série *ñb* (Fig. 16). A diferença de 211 Da sugere uma prolina e uma leucina/isoleucina.

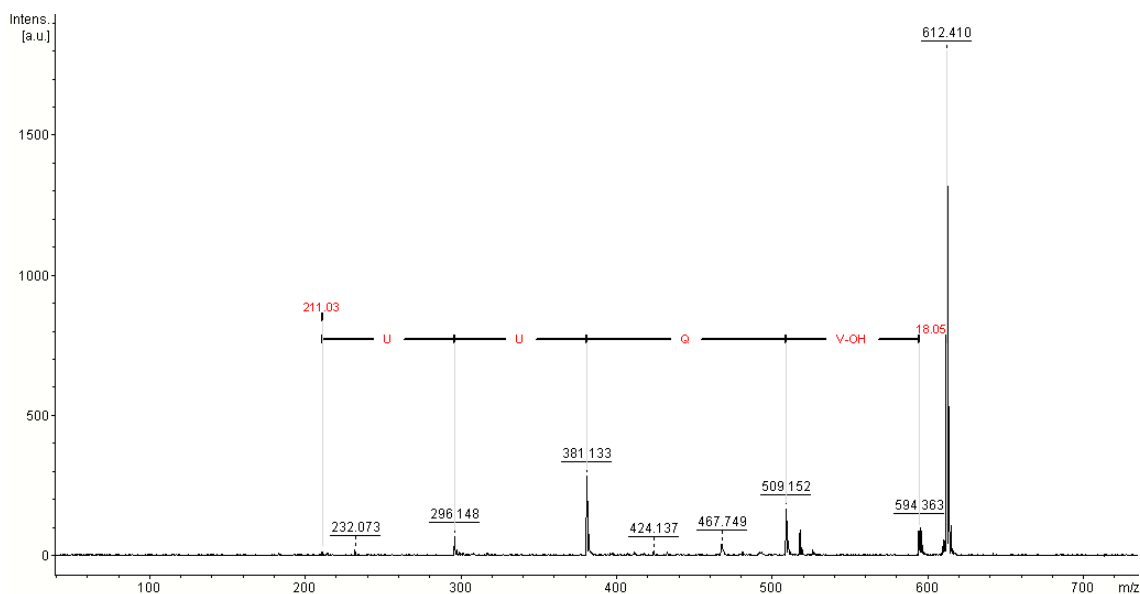


Figura 16. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 612,4 da fração 4, obtido por MALDI/TOF.

Após comparação da sequência encontrada com os bancos de dados, foi possível identificar um peptaibol denominado trichotoxina T5D2, com 1675 Da, descrita por Suwan e colaboradores (2000). Partindo desta referência, podemos pressupor que a diferença de 270 Da corresponde a um Aib+acetil, uma glicina, e um segundo Aib.

As trichotoxinas são um grupo de peptaibols com aproximadamente 27 componentes descritos. Foram inicialmente identificadas por Brückner & Przybylski (1984) provenientes de isolados de *T. viride*, e posteriormente também isoladas por Jaworski & Brückner (1999). Suwan e colaboradores (2000) identificaram novas trichotoxinas de linhagens de *T. harzianum* e Chutrakul e colaboradores (2008) de linhagens de *T. asperellum*, demonstrando pela primeira vez sua atividade antimicrobiana em testes contra

ichotoxina T5D2 identificada neste espectro
T. asperellum.

4.5 Fração 5

O espectro de massa desta fração permitiu observar vários íons, sendo que apenas o íon de m/z 1728,0 $[M+K^+]$ foi interpretado (Fig. 17). A interpretação do íon de m/z 1712,1 não foi possível pois parecia haver mais de um peptídeo sendo fragmentados juntos.

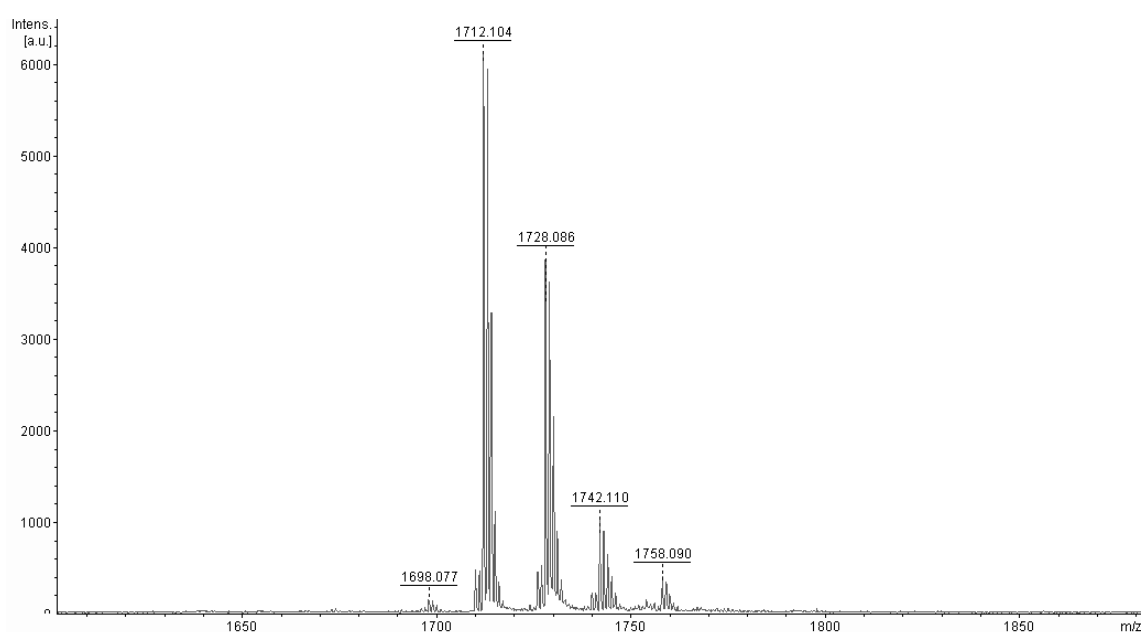


Figura 17. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 5 do extrato de *T. asperellum* TR356.

Novamente, é possível observar parte da série $\tilde{a}_y$, a maior parte da série $\tilde{a}_b$, e a diferença de 270 Da no início da série $\tilde{a}_b$. Também é possível notar a presença de um íon de potássio entre o Aib e a prolina, devido à fragilidade dessa ligação, como discutido (Fig. 18). Nesta fração, o íon de m/z 612 também é encontrado, e quando fragmentado possui mesma sequência do descrito anteriormente.

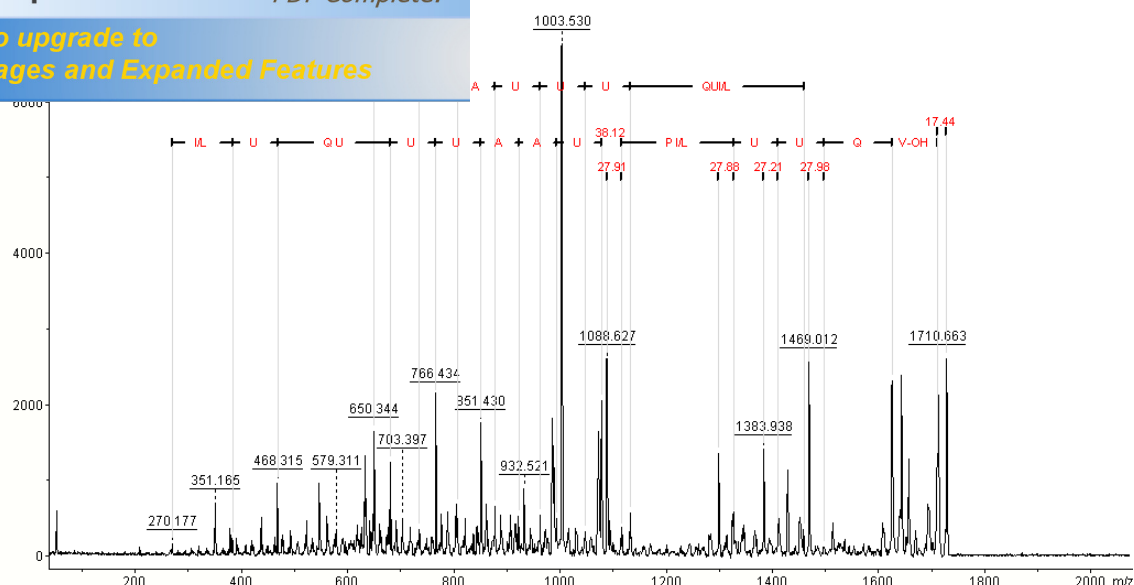


Figura 18. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1728,0 da fração 5, obtido por MALDI/TOF.

A análise da sequência obtida sugere que este peptaibol seja uma trichotoxina A-50 E (T5E), identificada pela primeira vez por Brückner & Przybylski (1984) e proveniente de isolados de *T. viride*. A partir desta informação, pressupõe-se que a diferença de 270 Da encontrada corresponda a um Aib+acetil, uma glicina, e um segundo Aib. Este peptaibol ainda não havia sido descrito em isolados de *T. asperellum*.

4.6 Fração 6

Na análise da fração 6 os dois íons mais proeminentes foram os com m/z 1712,1 $[M+Na^+]$ e 1728,0 $[M+Na^+]$ (Fig. 19)

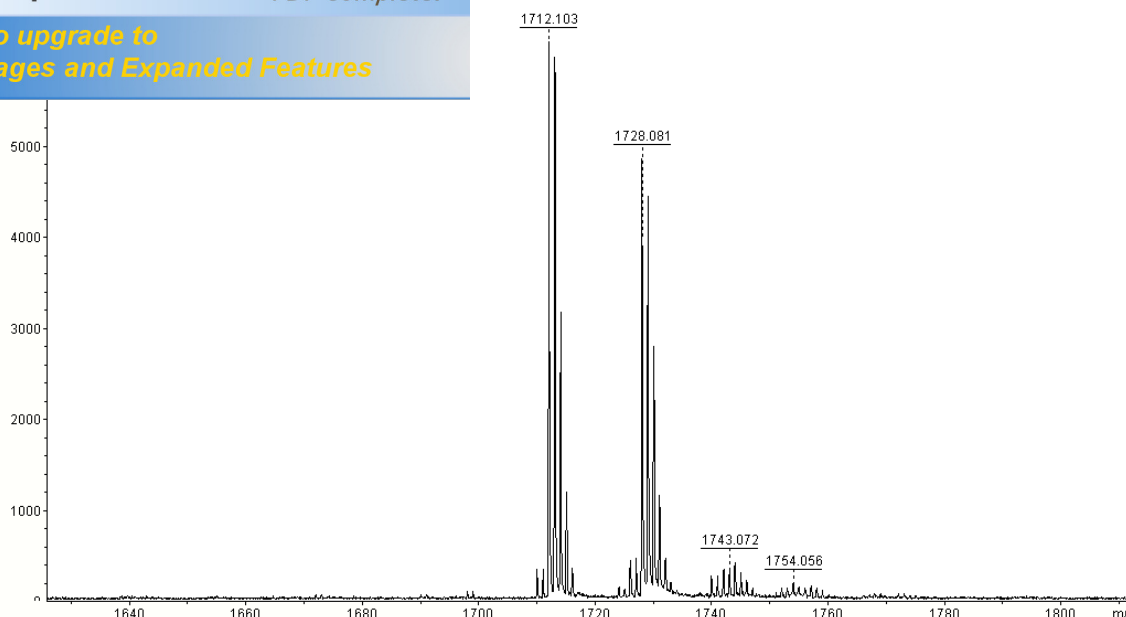


Figura 19. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 6 do extrato de *T. asperellum* TR356.

Na fragmentação do íon com m/z de 1712,1 $[M+Na^+]$ pode-se observar parte da série $\tilde{ny}$ e a maior parte da série $\tilde{nb}$. Como também relatado nas fragmentações anteriores, há a diferença de 270 Da no início da série $\tilde{nb}$, e a presença de íons de sódio, que nesta análise, se encontram em posições diferentes em cada série (Fig. 20).

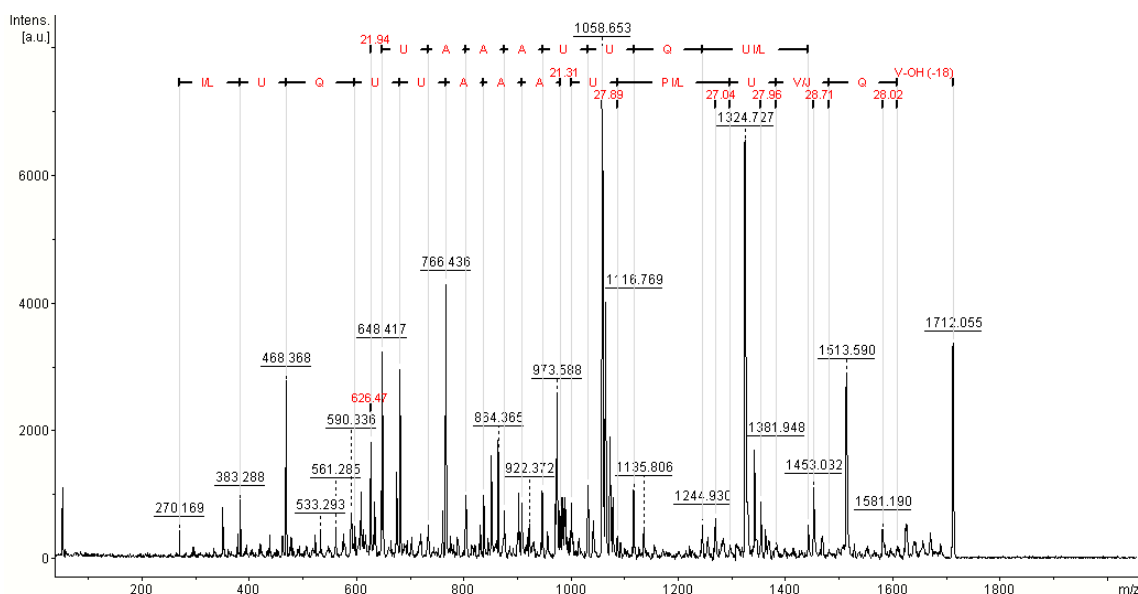


Figura 20. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1712,0 da fração 6 obtido por MALDI/TOF.

no íon de m/z 626,4, provavelmente devido à b discutida anteriormente. Dessa forma, ao olharmos para o espectro de massa da fração 6 nesta região, é possível detectar tal íon (Fig. 21), e ao fragmenta-lo (Fig. 22), confirmamos parte da série que não foi possível observar na fragmentação do íon de m/z 1712,1 $[M+Na^+]$.

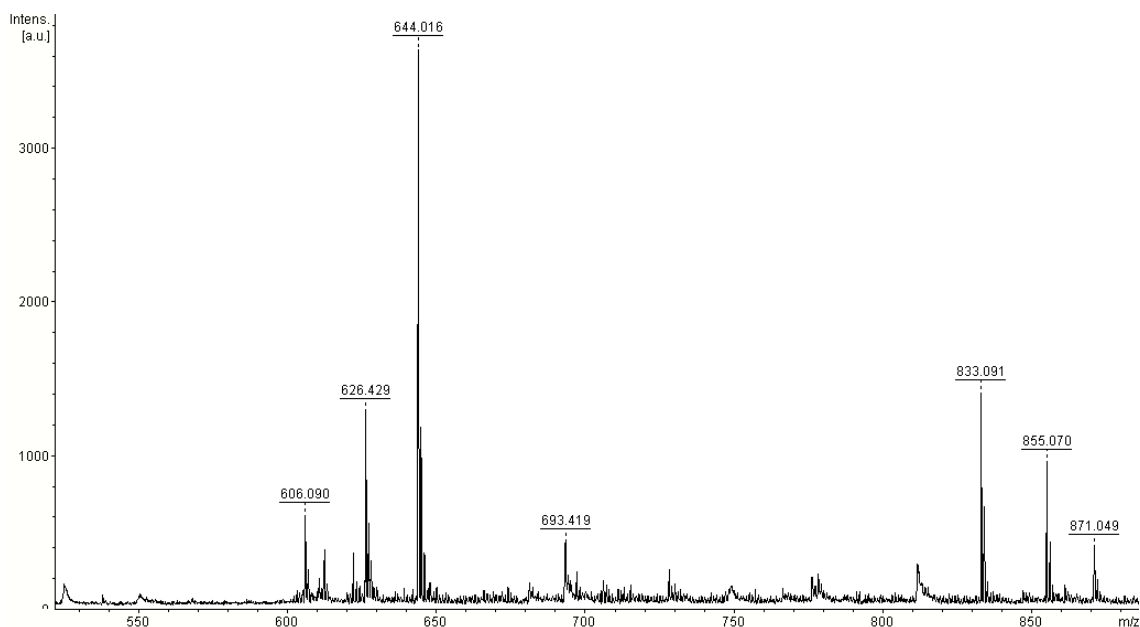


Figura 21. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 6 do extrato de *T. asperellum* TR356, detalhe para região de menor massa.

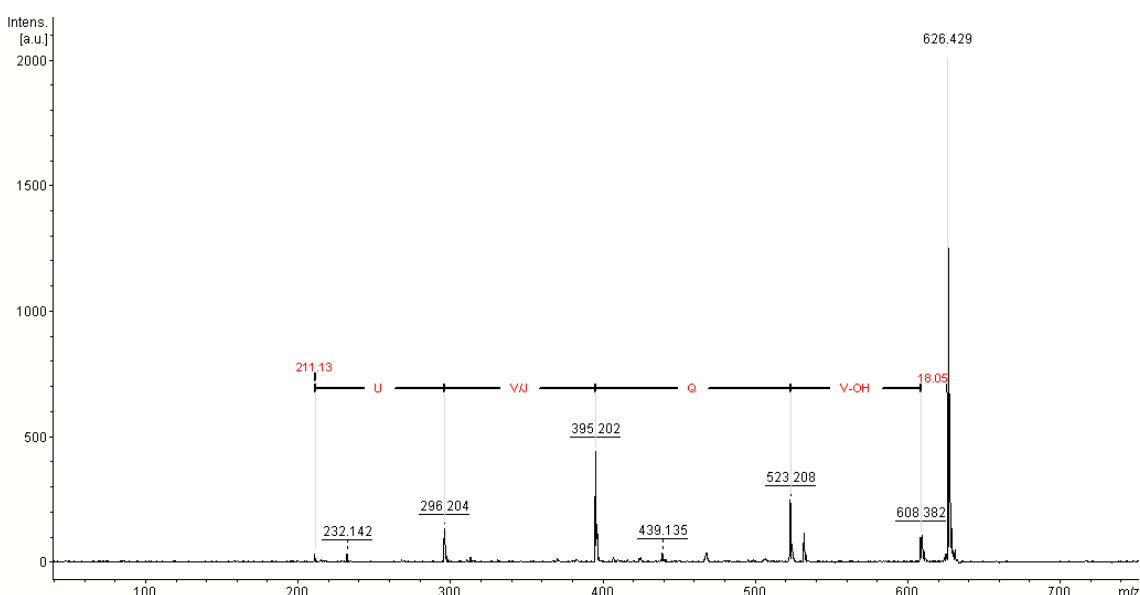


Figura 22. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 626,4 da fração 6, obtido por MALDI/TOF.

ntão, a análise desta sequência se mostrou
50 F (T5F), também descrita pela primeira vez
por Brückner & Przybylski (1984), em isolados de *T. viride*.

Na fragmentação do íon de m/z 1728,0 da fração 6, apenas uma
pequena parte da série **ñy** foi elucidada, e na série **ñb**, há a presença do íon de
sódio entre um Aib e uma alanina (Fig. 23).

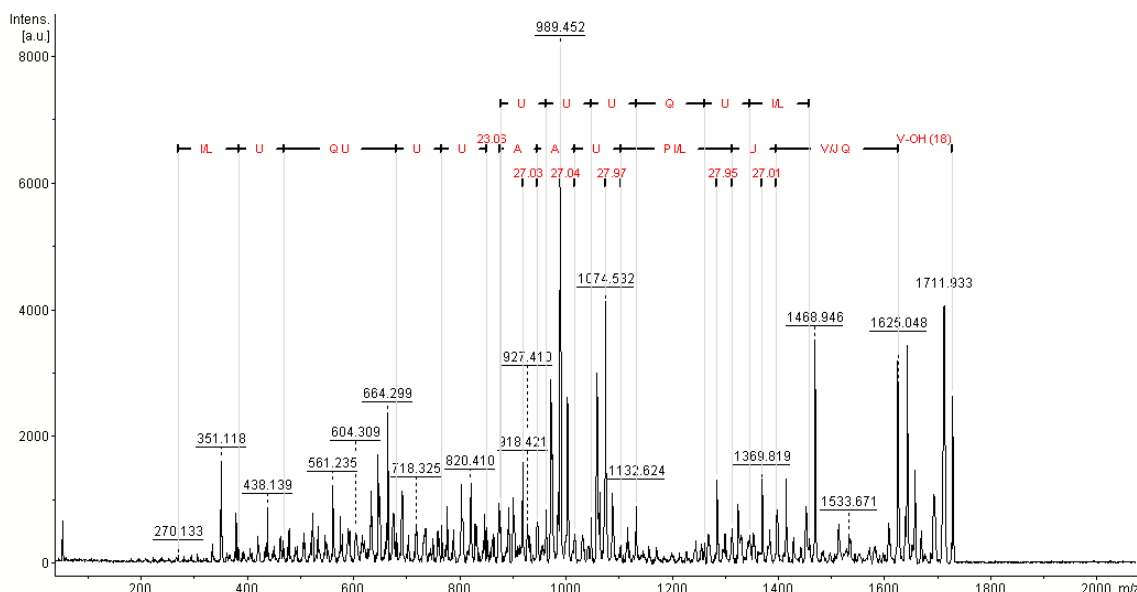


Figura 23. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1728,0 da fração 6, obtido por MALDI/TOF.

Esta sequência encontrada quando comparada aos bancos de dados é
semelhante à trichotoxina A-50 G (T5G), identificada inicialmente por Brückner
& Przybylski (1984), extraída de *T. viride*. Novamente, ambos
peptaibols encontrados nesta fração (T5F e T5G) também não haviam sido
descritos anteriormente sendo produzidos por isolados de *T. asperellum*.

4.7 Fração 7

No espectro obtido a partir da análise da fração 7, foram observados
dois íons mais proeminentes (Fig. 24), porém apenas o de m/z 1726,1 $[M+Na^+]$
foi elucidado.

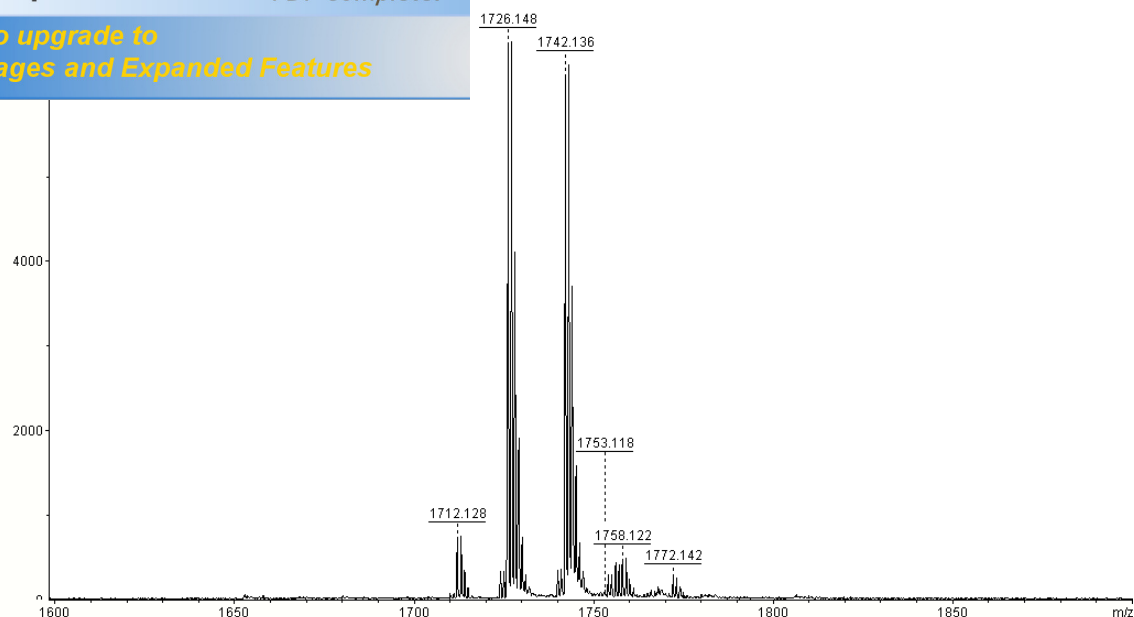


Figura 24. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 7 do extrato de *T. asperellum* TR356.

Na análise do espectro de massa desta fragmentação (Fig. 25), podemos observar parte de ambas as séries (-y e *ñb*). Novamente percebe-se a presença de um íon de sódio entre os resíduos de Aib e prolina, e neste espectro de massa, foi possível identificar os resíduos de aminoácidos presentes da porção N-terminal da série *ñy* do peptaibol, confirmando o que encontramos na literatura até aqui. Pela comparação desta sequência com os bancos de dados, parece ser semelhante à trichotoxina A-50 G (T5G), também encontrada na fração anterior.

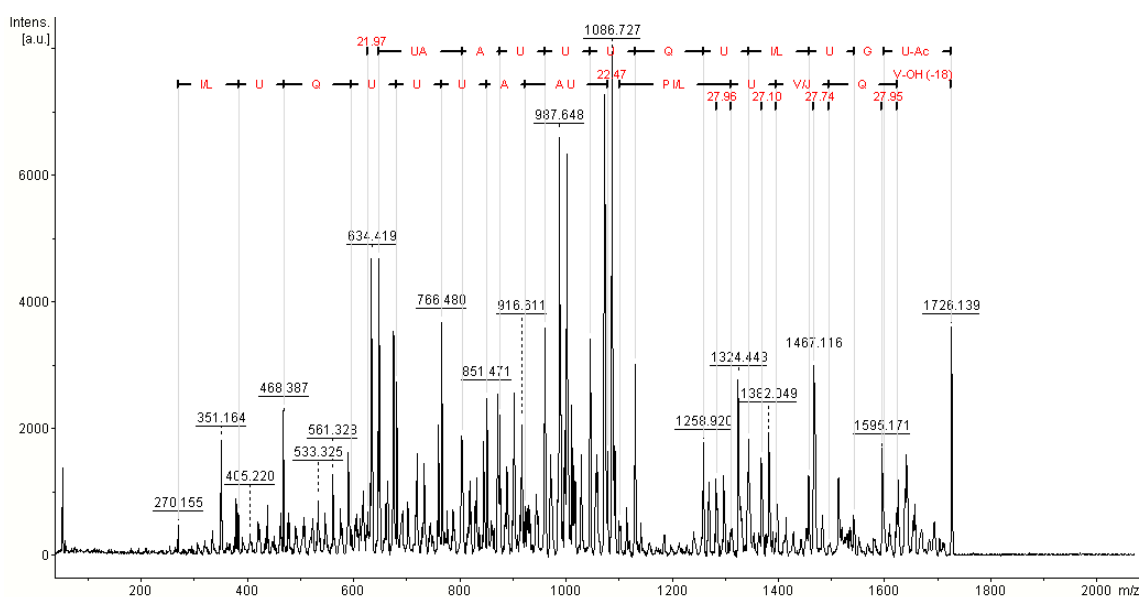


Figura 25. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1726,1 da fração 7, obtido por MALDI/TOF.

A análise da fração 8 (Fig. 26) foi idêntica a da fração 7, sendo que novamente apenas o íon m/z 1726,2[M+Na⁺] foi passível de interpretação (Fig.27), tendo sido identificado também como sendo uma trichotoxina A-50 G (T5G).

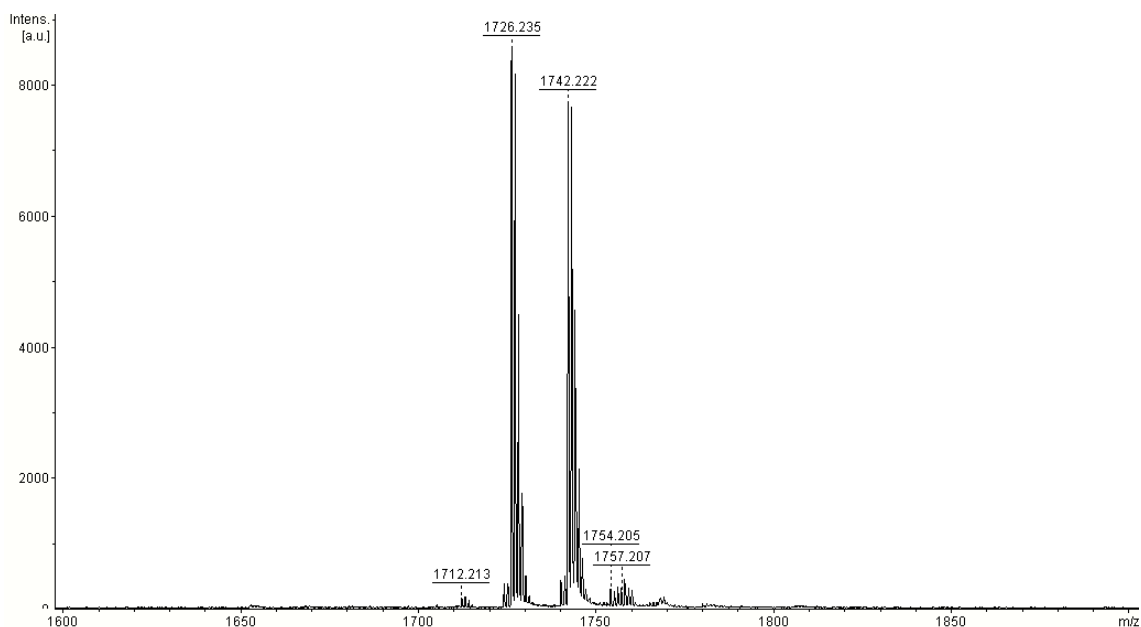


Figura 26. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 8 do extrato de *T. asperellum* TR356.

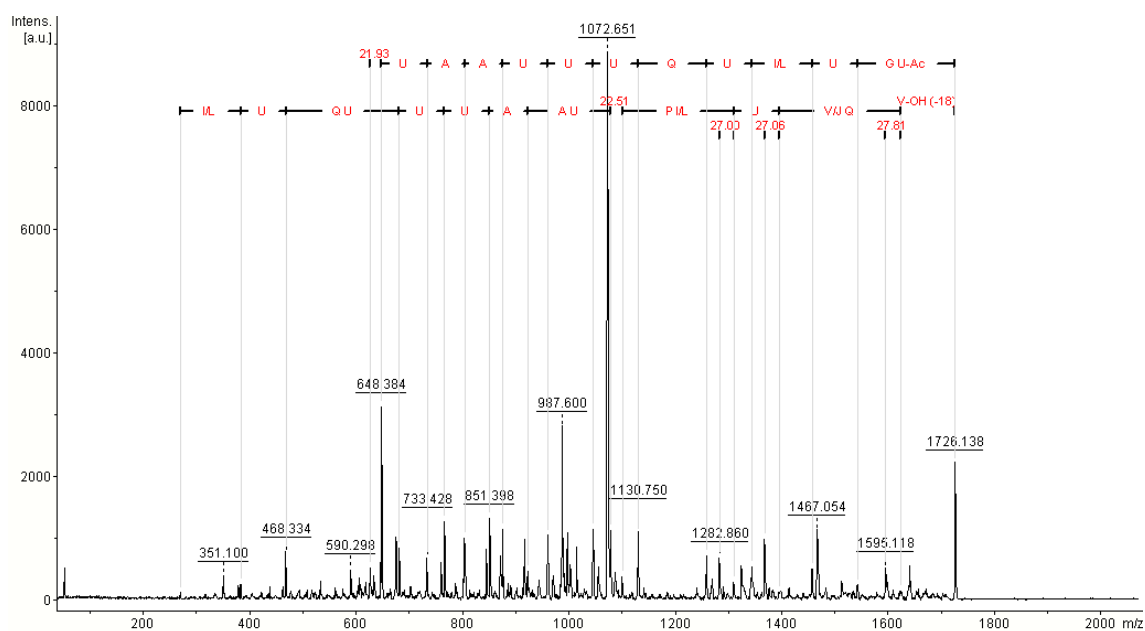


Figura 27. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1726,1 da fração 8, obtido por MALDI/TOF.

Nesta última fração coletada do extrato de *T. asperellum*, dois íons foram observados (Fig. 28), sendo que apenas o íon com m/z de 1740,2 [M+Na⁺] foi interpretado (Fig. 29).

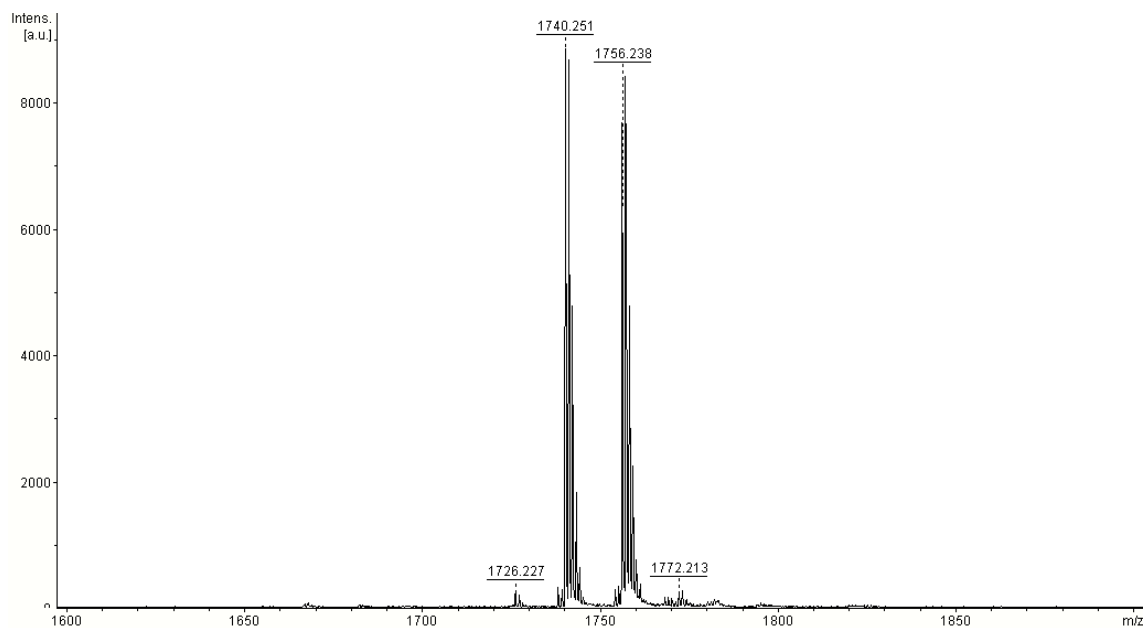


Figura 28. Espectro de massa por MALDI/TOF da fração 9 do extrato de *T. asperellum* TR356.

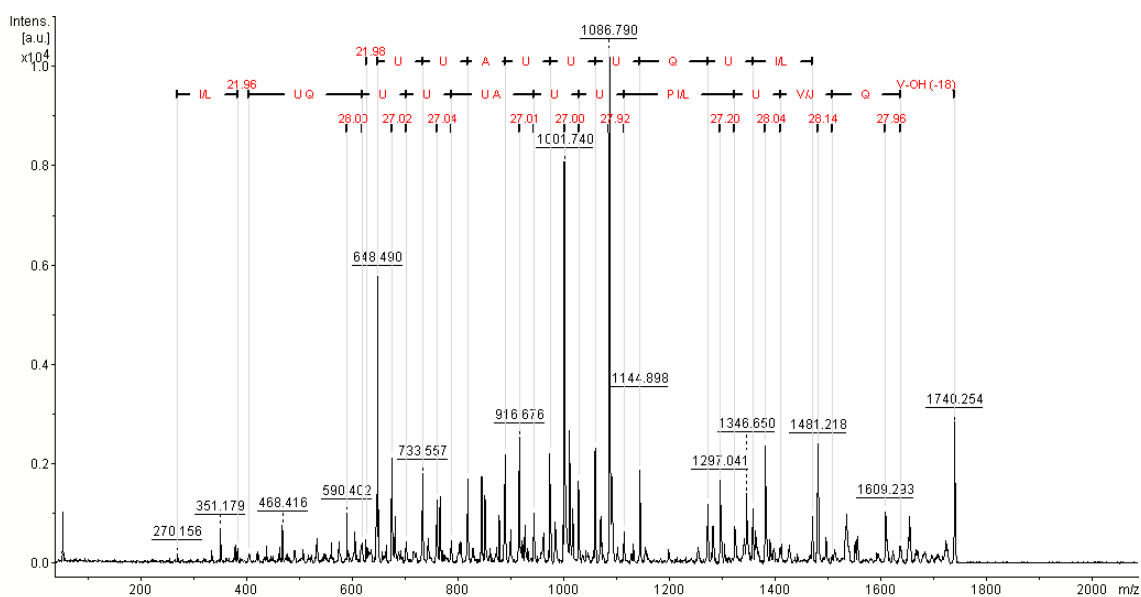


Figura 29. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1740,2 da fração 9, obtido por MALDI/TOF.

e massa podemos observar a presença dos na série **ñy**, e entre a leucina/isoleucina e Aib na série **ñb**. Esta sequência obtida é semelhante à trichotoxina 1717A, descrita por Chutrakul *et al.* (2008), isolada de linhagens *T. asperellum*, e que apresentava atividade antimicrobiana contra *B. stearotherophilus*.

As tabelas a seguir resumem as informações das análises dos espectros de massa de cada fração obtida do extrato de *T. asperellum* TR356. Um aspecto interessante é a presença da Trichotoxina T5G em 3 frações diferentes. O fato de terem sido coletadas em momentos diferentes da cromatografia demonstra que há diferenças em suas estruturas que alteram sua hidrofobicidade, como modificações pós-traducionais. Porém, apenas pela análise por espectrometria, não foi possível observar quais são estas diferenças, sendo necessário análises futuras por RMN.

Tabela 1. Sequência dos peptaibols encontrados no extrato de *T. asperellum* TR356

Peptaibol	Mod.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
n.i.	112	Thr	Val	Aib	Lxx	Aib	Aib		237										
n.i.	112	Thr	Val	Aib	Lxx	Aib	Aib	Ala	Throl										
Asperelina E	Ac	<i>Aib</i>	<i>Aib</i>	Val	Aib	Lxx	Aib	Aib	Ser	<i>Aib</i>	<i>Prool</i>								
Asperelina A	Ac	<i>Aib</i>	<i>Aib</i>	Val	Aib	Lxx	Aib	Aib	Ala	<i>Aib</i>	<i>Prool</i>								
Trichotoxina T5D2	Ac	<i>Aib</i>	<i>Gly</i>	<i>Aib</i>	Lxx	Aib	Gln	Aib	Aib	Ala	Ala	Ala	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Trichotoxina A-50 E (T5E)	Ac	<i>Aib</i>	<i>Gly</i>	<i>Aib</i>	Lxx	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Ala	Aib	Pro	Lxx	Aib	Aib	Gln	Valol
Trichotoxina A-50 F (T5F)	Ac	<i>Aib</i>	<i>Gly</i>	<i>Aib</i>	Lxx	Aib	Gln	Aib	Aib	Ala	Ala	Ala	Aib	Pro	Lxx	Aib	Vxx	Gln	Valol
Trichotoxina A-50 G (T5G)	Ac	<i>Aib</i>	<i>Gly</i>	<i>Aib</i>	Lxx	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Ala	Aib	Pro	Lxx	Aib	Vxx	Gln	Valol
Trichotoxina 1717A	Ac	<i>Aib</i>	<i>Gly</i>	<i>Aib</i>	Lxx	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Aib	Aib	Pro	Lxx	Aib	Vxx	Gln	Valol

n.i – Não Identificado; Mod. – Modificação N-terminal; Aminoácidos deduzidos através da comparação com bancos de dados em itálico; Posições onde há variações nos aminoácidos em negrito.

Tabela 2. Informações adicionais dos peptaibols encontrados no extrato de *T. asperellum* TR356

Peptaibol	<i>m/z</i>	Fração	TR (min)
n.i.	935,6 [M+H ⁺]	2	34,3
n.i.	919,6 [M+H ⁺]	3	36,6
Asperelina E	953,6 [M+H ⁺]	2	34,3
Asperelina A	937,6 [M+H ⁺]	3	36,6
Trichotoxina T5D2	1698,0 [M+Na ⁺]	4	38,4
Trichotoxina A-50 E (T5E)	1728,0 [M+K ⁺]	5	39,1
Trichotoxina A-50 F (T5F)	1712,0 [M+Na ⁺]	6	39,5
Trichotoxina A-50 G (T5G)	1726,1 [M+Na ⁺]	6 7 8	39,5 40,1 40,7
Trichotoxina 1717A	1740,2 [M+Na ⁺]	9	42

n.i – Não Identificado; *m/z* – Relação massa/carga; TR – Tempo de retenção durante a cromatografia.

O gênero *Trichoderma* é conhecido por atuar como ACB através de diversos mecanismos incluindo a produção de peptaibols. Dentre vários representantes do gênero, o isolado *T. asperellum* TR356 foi descrito recentemente como um eficiente ACB contra *S. Sclerotiorum* em campo, porém a produção de metabólitos secundários neste isolado não havia sido reportada anteriormente. Através dos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que o isolado *T. asperellum* TR356 é capaz de produzir diferentes peptaibols, como as asperelinas A e E, e trichotoxinas T5D2, 1717A e A-50 E, F e G. Muitos destes peptaibols já haviam sido descritos sendo produzidos por linhagens de *T. asperellum* e outras espécies de *Trichoderma*, porém, este é o primeiro relato destes compostos sendo produzidos por uma linhagem de *T. asperellum* isolada no Brasil. Não foi possível mensurar a atividade antimicrobiana dos peptaibols encontrados, já que a produção destes foi insuficiente para tal análise. Porém análises futuras serão necessárias para elucidar o envolvimento destes compostos no processo de controle biológico exercido pelo *Trichoderma* sobre fitopatógenos, além da elucidação da estrutura tridimensional destas moléculas.

Amelida FBR, Cerqueira FM, Silva RN, Ulhoa CJ. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett* 2007, 29:1189-1193.

Béven L, Duval D, Rebuffat S, Riddell FG, Bodo B, Wróblewski H. Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1372:78-90.

Bissett J, Nolan CA, Szakacs G, Druzhinina I, Gradinger C, Kubicek CP. New species of *Trichoderma* from Asia. *Can J Bot* 2003, 81:570-586.

Brückner H, Przybylsky M. Isolation And Structural Characterization Of Polypeptide Antibiotics Of The Peptaibol Class By High-Performance Liquid Chromatography With Field Desorption And Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J Chromatogr* 1984, 296:263-275.

Cantú MD, Carrilho E, Wulff NA, Palma MS. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim Nova* 2008, 31(3): 669-675.

Chutrakul C, Alcocer M, Bailey K, Peberdy JF. The Production and Characterisation of Trichotoxin Peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. *Chem Biodivers* 2008, 5:1694-1705.

Corabi-Adell C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES ñ FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil. 2004.

Cutler HG, Cox RH, Crumley FG, Cole PD. 6-Pentyl- δ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agric Biol Chem* 1986, 50:2943-2945.

Daniel JFS, Filho ER. Peptaibols of *Trichoderma*. REVIEW. *Nat Prod Rep* 2007, 24:1128-1141.

De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, Höfte M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 1998, 104:279-286.

Degenkolb T, Berg A, Gams W, Schlegel B, Gräfe U. The Occurrence of Peptaibols and Structurally Related Peptaibiotics in Fungi and their Mass Spectrometric Identification via Diagnostic Fragment Ions. *J Pept Sci* 2003, 9:666-678.

Degenkolb T, Døghren HV, Nielsen NF, Samuels GJ, Brückner H. Recent Advances and Future Prospects in Peptaibiotics, Hydrophobin, and Mycotoxin Research, and Their Importance for Chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. REVIEW. *Chem Biodivers* 2008, 5:671-679(a).

Jørgensen KF, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri F, Smalzer A, Brückner H, Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels GJ. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycol Prog*2008,7:177-219(b).

Delgado GV. *et al.* Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. in vitro. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento2007, 12:1676-1340.

Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2000, 69:1-39.

Duval D,Rebuffat S, Goulard C, Prigent Y, Becchi M, Bodo B. Isolation and sequence analysis of the peptide antibiotics trichorzins PA from *Trichoderma harzianum*. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1997 1:2147-2153.

Ferreira CR, Saraiva SA, Garcia JS,*et al.*Princípios E Aplicações Da Espectrometria De Massas Em Produção Animal.Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal, Embrapa Pecuária Sudeste ã São Carlos ã SP ã Brasil, 2009.

Gams W, Bisset J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In:HarmanGE, Kubicek CP.*Trichoderma & Gliocladium*. 1. Ed. Taylor and Francis, London. 1998, p. 3-34

Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC,Barbosa ET, Rodrigues AR, Brandão RS, Ulhoa CJ, Lobo-Junior M. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biol Cont*2013, 67:308-316.

Gorres KL, Raines RT.Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*2010, 45(2):106-124.

Haran S, Schickler H, Chet I. Molecular mechanisms of lytic enzymesinvolved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiol*1996, 142:2321-2331.

Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol*2006, 96:190-194.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M.*Trichoderma* species ã opportunistic, avirulent plant symbionts.*Microbiol*2004, 2:43-56.

Howell CR. Cotton seedling pre emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathol*2002, 92:177-180.

Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol Control*2009, 51:409-416.

S, Kusai A, Suzuki A. Structural elucidation of minor components of peptaibol antibiotic P168s (Leucinostatins) by tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992, 56(7):1079-1085.

Jaworski A, Brückner H. Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999, 862:179-189.

Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ* 2008, 9(10):753-763.

Küçük Ç, Kivanç M, Kinaci E, Kinaci G. Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. *Biologia* 2008, 63(2):167-170.

Kunieda-Alonso S, Alfenas AC, Maffia LA. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. *Fitopatol Bras* 2005, 30:164-168.

Leclerc G, Goulard C, Prigent Y, Bodo B, Wróblewski H, Rebuffat S. Sequences and Antimycoplasmic Properties of Longibrachins LGB II and LGB III, Two Novel 20 Residue Peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Nat Prod* 2001, 64:164-170.

Lima AL. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp isolados de solo do cerrado brasileiro. Tese de Doutorado, UnB, Departamento de Fitopatologia, 73p. Brasília. 2002.

Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B, Kubicek CP. Cell Wall Synthesis Is a Major Target of Mycoparasitic Antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 1996, 178(21):6382-6385.

Lucaciu M, Rebuffat S, Goulard C, Duclohier H, Molle G, Bodo B. Interaction of the 14-residue peptaibols, harzianins HC, with lipid bilayers: permeability modifications and conductance properties. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1323:85-96.

Lumsden RD, Locke JC, Adkins ST, Walter JF, Ridout CJ. Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathol* 1992, 82:230-235.

Maddau L, Cabras A, Franceschini A, Linaldeddu BT, Crobu S, Roggio T, Pagnozzi D. Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol* 2009, 155:3371-3381.

Marahiel MA, Mootz HD. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Curr Opin Chem Biol* 1997, 1:543-551.

edics L, Grigoriev PA, Sundell N, Salkinoja-
id 11-residue peptaibols from the fungus
Trichoderma longibrachiatum are synergistic in forming Na⁺/K⁺-permeable
channels and adverse action towards mammalian cells. FEBS J2012,
279(4):172ñ4190.

Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. Ways of assembling complex natural
products on modular nonribosomal peptide synthetases. ChemBioChem2002,
3(6):490-504.

Mortuza MG, Ilag LL. Potential for Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*
(Pat.)Griff.& Maubl.in banana fruits by *Trichoderma* species. Biol Cont1999,
15:235ñ240.

Mukherjee PK, Wiest A, Ruiz N, Keightley A, Moran-Diez ME, Mccluskey E,
Pouchus YF, Kenerley CM. Two Classes of New Peptaibols Are Synthesized by
a Single Non-ribosomal Peptide Synthetase of *Trichoderma virens*. J Biol
Chem2011, 286(6):4544ñ4554.

Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM. Secondary metabolism in
Trichoderma ñ a genomic perspective. Microbiol2012, 158: 35ñ45.

Neuhof T, Dieckmann R, Druzhinina IS, Kubicek CP, Döhren HV. Intact-cell
MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus
Trichoderma/ *Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol
structures? Microbiol2007, 153:3417ñ3437.

O'Brien J, Wright GD. An ecological perspective of microbial secondary
metabolism. Curr Opin Biotechnol2011, 22:552ñ558.

Okigbo RN, Oikediugwu FEO. Studies on biological control of postharvest rot in
yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. Phytopathol2000, 148:351-
355.

Osborn A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for
chemical innovation. Trends Genet2010, 26:10.

Panizel I, Yarden O, Ilan M, Carmeli S. Eight New Peptaibols from Sponge-
Associated *Trichoderma atroviride*. Mar Drugs2013, 11:4937-4960.

Parker SR, Cutler HG, Jacyno JM, Hill RA. Biological activity of 6-pentyl 2H-
pyran-2-one and its analogs. J Agric Food Chem1997, 45:2774-2776.

Patron NJ, Waller RS, Cozijnsen AJ, Straney DC, Gardiner DM, Nierman WC,
Howlett BJ. Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene
clusters in filamentous ascomycetes. BMC Evol Biol2007, 7:174.

Peltola J, Ritieni A, Mikkola R, Grigoriev PA, Pócsfalvi G, Andersson MA,
Salkinoja-Salonen MS. Biological Effects of *Trichoderma harzianum* Peptaibols
on Mammalian Cells. Appl Environ Microbiol2004, 70(8):4996.

Montagu M, Amiard JC, Pouchus YF. Toxicity of contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat Toxicol* 2007, 85:254-262.

Psurek A, Neusüß C, Degenkolb T, Brückner H, Balaguer E, Imhof D, Scriba GKE. Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Pept Sci* 2006, 12(4):279-290.

Rahaman A, Lazaridis T. A thermodynamic approach to alamethicin pore formation. *Biochim Biophys Acta* 2014, 1838:98-105.

Rebuffat S, Prigent Y, Auvin-Guette C, Bodo B. Tricholongins BI and BII, 19-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum* Solution structure from two-dimensional NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 1991, 20:661-674.

Rebuffat S, Goulard C, Bodo B. Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *J Chem Soc Perkin Transact* 1995, 1:1849-1855.

Rebuffat S, Goulard C, Leclerc G, Bodo B. Directed Biosynthesis of Peptaibol Antibiotics in Two *Trichoderma* Strains. *J Antibiot* 1998, 51(2):170-177.

Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* 2008, 7:89-123.

Ren J, Xue C, Tian L, Xu M, Chen J, Deng Z, Proksch P, Lin W. Asperelines A-F, Peptaibols from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma asperellum*. *J Nat Prod* 2009, 72(6):1036-1044.

Ren J, Yang Y, Liu D, Chen W, Proksch P, Shao B, Lin W. Sequential determination of new peptaibols asperelines G-Z12 produced by marine-derived fungus *Trichoderma asperellum* using ultrahigh pressure liquid chromatography combined with electrospray-ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013, 1309:90-95.

Renshaw JC, Robson GD, Trinci APJ, Wiebe MG, Livens FR, Collison D, Taylor RJ. Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycol Res* 2002, 106:1123-1142.

Samuels GJ. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathol* 2006, 96:195-206.

Samuels GJ, Pardo-Schultheiss R, Hebbar KP, Lumsden RD, Bastos CN, Costa JC, Bezerra JL. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol Res* 2000, 104(6):760-764.

Scherm B, Schmoll M, Balmas V, Kubicek CP, Migheli C. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high

Rhizoctonia solani by a rapid subtraction
†2008, 55:81-91.

Schirmböck M, Lorito M, Wang Y, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman GE, Kubicek CP. Parallel Formation and Synergism of Hydrolytic Enzymes and Peptaibol Antibiotics, Molecular Mechanisms Involved in the Antagonistic Action of *Trichoderma harzianum* against Phytopathogenic Fungi. *Appl Environ Microbiol*1994, 60(12):4364-437.

Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*2003, 20:275-287.

Shuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*2010, 87:787-799.

Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*1999, 6(8):493-505.

Stoppacher N, Neumann NK, Burgstaller L, Zeilinger S, Degenkolb T, Brückner H, Schuhmacher R. The Comprehensive Peptaibiotics Database, *Chem Biodivers*2013, 10:734-743.

Stoppacher N, Reithner B, Omann M, Zeilinger S, Krska R, Schuhmacher R. Profiling of trichorzianines in culture samples of *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*2007, 21:3963-3970.

Suwan S, Isobe M, Kanokmedhakul S, Lourit N, Kanokmedhakul K, Soyong K, Koga K. Elucidation of high micro-heterogeneity of an acidic-neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*2000, 35(12):1438-1451.

Thangavelu R, Palaniswami A, Velazhahan R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agric Ecosyst Environ*2004, 103:259-263.

Toniolo C, Crisma M, Formaggio F, Peggion C, Epand RF, Epand RM. Lipopeptaibols, a novel family of membrane active, antimicrobial peptides. *Cell Molec Life Sci*2001, 58:1179-1188.

Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *Biochem Eng J*2007, 37:1-20.

Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti EL, Lorito M, Sivasithamparam K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett Appl Microbiol*2006, 43:143-148.

Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo S, Lorito M. *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Phytopathol*2008, 72:80-86(a).

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Soil Biol Biochem*2008, 40:110 (b).

Vinale F, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Marra R, Ritieni A, Ferracane R, Woo S, Lorito M. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol*2009, 48:705-711.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Ruocco M, Woo S, Lorito M. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun*2012, 7:1545-1550 (a).

Vinale F, Arjona GI, Nigro M, Mazzei P, Piccolo A, Ruocco M, Woo S, Ruano R D, López Herrera C, Lorito M. Cerinolactone, a hydroxy-lactone derivative from *Trichoderma cerinum*. *J Nat Prod*2012, 75:103-106(b).

Vinale, F, et al. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett*2013, 347(2):123-129.

Viterbo A, Ramot O, Chernin L, Chet I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*2002, 81:549-556.

Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I, Kenerley C. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Mol Plant Pathol*2007, 8(6):737-746.

Wang HN, Shi M, Xie ST, Luo Y, Sun CY, Chen XL, Zhang YZ. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer*2010, 9(26):1-16.

Webster J, Lomas N. Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin? *Trans Brit Mycol Soc*1964, 47:535-540.

Weindling R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathol*1932, 22:837-845.

Wilhite SE, Lumsden RD, Straney DC. Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium damping-off*. *Phytopathol*1994, 84:816-821.

Zimand G, Elad Y, Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathol*1996, 86:1255-1260.