

# Caracterização molecular de transformantes de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422 visando à identificação de genes envolvidos na clivagem de polissacarídeos

Rebeca Alves Felix<sup>1</sup>, Gláucia Emy Okida Midorikawa<sup>2</sup>, Ayla Santana da Silva<sup>3</sup>, Elba Pinto da Silva Bon<sup>4</sup>, Léia Cecília de Lima Fávares<sup>5</sup>

## Resumo

Aumentar a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é um desafio para aproveitar melhor essa fonte para produção de biocombustíveis e químicos. O uso de microrganismos capazes de produzir alta concentração de enzimas para hidrólise em substratos de baixo custo é apresentado como uma solução para o processo. A Embrapa Agroenergia está realizando o melhoramento genético de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422, com o objetivo de alcançar níveis mais elevados de produção de enzimas (hemi) celulolíticas. Como parte desse projeto, fez-se a caracterização enzimática e molecular de 11 agrotransformantes de *T. harzianum* CFAM-422 previamente obtidos (SHIMIZU et al., 2015), visando à identificação de genes envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas. Os resultados de testes enzimáticos mostraram que alguns transformantes apresentam perfil enzimático diferente quando comparado à linhagem parental. A região de inserção de T-DNA foi amplificada por TAIL-PCR com os iniciadores específicos LB1, LB2 e LB3 e iniciadores degenerados AD1, AD2 e AD3. Os resultados obtidos até o momento mostraram que os fragmentos não flanqueavam o T-DNA, por isso é necessário realizar novas análises de PCR-TAIL com outros iniciadores degenerados para identificar as mudanças genéticas nessas cepas.

**Palavras-chave:** mutagênese insercional. transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. melhoramento genético. fungos filamentosos.

## Introdução

O interesse no uso da biomassa para a produção de biocombustíveis e químicos tem despertado a atenção da comunidade científica para os desafios técnicos que precisam ser superados (MARGEOT et al., 2009). Um desses desafios é a sacarificação eficiente da biomassa em decorrência do alto custo das enzimas para a hidrólise.

<sup>1</sup> Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, rebeca.felix@colaborador.embrapa.br

<sup>2</sup> Bióloga, pós-doutoranda, Embrapa Agroenergia, glaucia.midorikawa@colaborador.embrapa.br

<sup>3</sup> Bióloga, doutora em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, aylasantana@gmail.com

<sup>4</sup> Bióloga, pós-doutora em Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, elba1996@gmail.com

<sup>5</sup> Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

Fungos como *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são reconhecidos por sua capacidade de produzir enzimas para aplicação no processo de conversão enzimática da biomassa vegetal. No entanto, tais microrganismos podem ter limitações na produção de uma ou outra enzima celulolítica, limitando a eficiência do processo de hidrólise (KUMAR et al., 2008).

A Embrapa Agroenergia está realizando o melhoramento genético da cepa *T. harzianum* CFAM-422 para atingir maiores níveis de produção de enzimas celulolíticas. Como parte desse projeto, uma biblioteca de 402 transformantes desse fungo foi obtida por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (SHIMIZU et al., 2015). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização enzimática e molecular desses transformantes, visando à identificação de genes envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas em *T. harzianum* CFAM-422.

## Materiais e métodos

### Caracterização do perfil de degradação de polissacarídeos dos transformantes selecionados

Foram selecionadas 11 linhagens de agrotransformantes de *T. harzianum* CFAM-422 da biblioteca previamente obtida (SHIMIZU et al., 2015), que apresentaram diferentes valores de índice enzimático em substrato carboximetilcelulose em comparação com o parental CFAM-422. Em seguida, um ensaio enzimático foi realizado para determinar o perfil de degradação de outros polissacarídeos desses transformantes selecionados. Foi utilizado o meio mínimo de *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO et al., 1953), sendo a glicose substituída por 10 g/L de cada polissacarídeo: carboximetilcelulose, xilana, pectina (pH 5), pectina (pH 7) ou amido. Os transformantes foram inoculados nesses meios seletivos (triplicata) e incubados durante 4 dias a 28 °C. Após esse período, foi avaliada a capacidade de degradar o substrato, analisando a formação de halo de hidrólise, revelada por meio do uso de corantes específicos (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). O índice enzimático (EI) foi calculado (como EI = diâmetro de degradação halo / diâmetro da colônia).

### Extração de ácidos nucleicos de conídios e confirmação da transformação por PCR

Os ácidos nucleicos dos 11 transformantes selecionados foram extraídos de conídios, como descrito por Fávoro (2009), com modificações (SHIMIZU et al., 2015). A quantificação foi realizada por análise em espectrofotômetro. A confirmação da transformação foi realizada por PCR com os iniciadores hph1 e hph2 para o gene que confere resistência à higromicina B, localizado no T-DNA (FAVARO, 2009). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, com dNTP 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub> 3,7 mM; Tampão 1X; 0,2 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen) e 0,2 µM de cada iniciador. A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de amplificação (1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C e 1 min a 72 °C) e extensão final por 7 minutos a 72 °C. O DNA do vetor pFAT-gfp foi usado como controle positivo. Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio e fotodocumentado sob luz UV.

## Amplificação de regiões que flanqueiam o T-DNA por TAIL-PCR, clonagem e sequenciamento

As regiões que flanqueiam o T-DNA foram amplificadas por TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) (LIU; WHITTIER, 1995). Três reações de PCR sucessivas foram realizadas utilizando iniciadores específicos para sequências da borda esquerda do T-DNA (LB1, LB2 e LB3) juntamente com primers degenerados (AD1, AD2 e AD3) descritos por Fávoro (2009). A amplificação por TAIL-PCR foi realizada seguindo as condições descritas por Mullins et al. (2001). Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados sob luz UV. Esses produtos foram clonados em pGEM-T easy (Promega) e transformados em *Escherichia coli* DH10B. Os plasmídeos contendo as inserções foram extraídos, purificados e sequenciados com os primers universais M13F e M13R (Eurofins, Brasil).

## Resultados e Discussão

A estratégia de mutagênese insercional aleatória mediada por *A. tumefaciens* foi estabelecida para *T. harzianum* CFAM-422 e uma biblioteca de transformantes foi previamente obtida e caracterizada visando à identificação de genes de interesse (SHUMIZU et al., 2015). Um modo simples e rápido de triagem de agrotransformantes para avaliação da capacidade de produção de enzimas hidrolíticas é o uso de testes em meio de cultura sólido. Nesse contexto, 11 transformantes previamente caracterizados quanto à produção de endoglicanase, em substrato carboximetilcelulose (SHIMIZU et al., 2015), foram caracterizados no presente estudo também quanto à capacidade de produção de xilanase, amilase e pectinases (pectina liase e poligalacturonase). A análise enzimática mostrou que alguns transformantes apresentam diferenças de valores de índice enzimático em comparação com a linhagem parental. As mudanças observadas foram relacionadas tanto ao aumento dos valores de índice enzimático, quanto à perda total da capacidade de degradação, conforme resultados mostrados na Tabela 1.

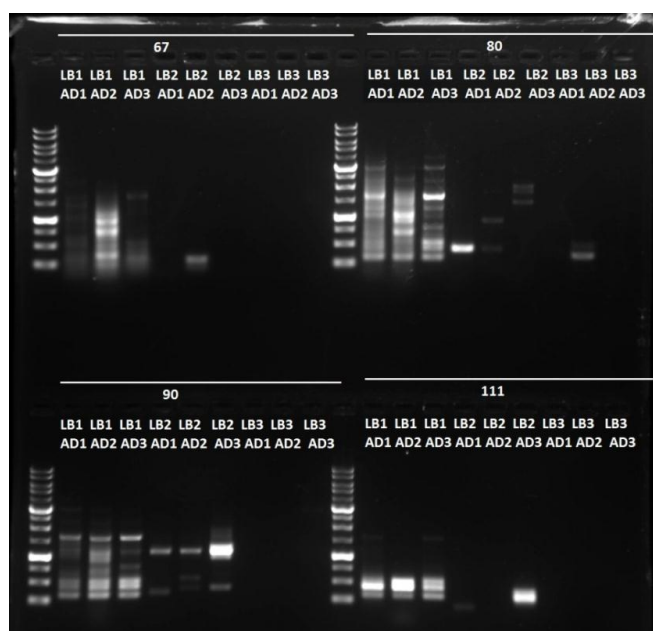
De acordo com os dados apresentados, para o meio carboximetilcelulose as linhagens 67, 90, 161 e 564 apresentaram maior diferença de degradação do parental. Já para o substrato pectina pH 5 (produção de poligalacturonase), as linhagens que se destacaram foram 67, 81 e 564. Alterando o pH da pectina para 7 (pectina liase), apenas duas linhagens apresentaram perfil diferente, 90 e 564. No substrato xilana, as linhagens diferentes do parental foram 111, 387 e 584. Por fim, para o meio de amido, todas as linhagens apresentaram o mesmo perfil de degradação que o parental. Devido a esses resultados, essas cepas foram selecionadas para caracterização dessas diferenças a nível molecular.

**Tabela 1:** Avaliação do índice enzimático de 11 agrotransformantes de *T. harzianum* CFAM-422 em carboximetilcelulose, pectina pH 5, pectina pH 7, xilana e amido, em comparação à linhagem selvagem.

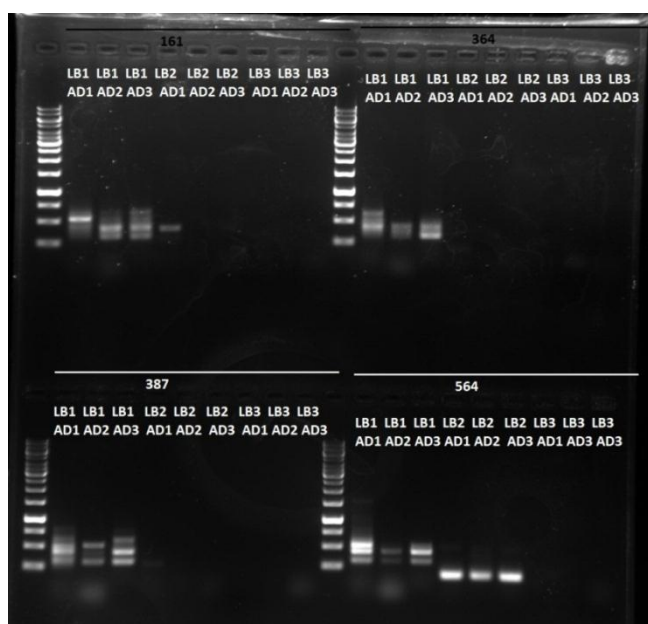
Linhagem	Substratos avaliados									
	Carboximetil-celulose		Pectina pH 5		Pectina pH 7		Xilana		Amido	
		Desvio padrão		Desvio Padrão		Desvio padrão		Desvio padrão		Desvio padrão
CFAM-422	1,01	0,02	1,21	0,19	3,33	0,07	1,37	0,03	1,00	0,00
67	1,17	0,02	1,47	0,05	3,50	0,16	1,21	0,02	1,00	0,00
80	1,00	0,01	1,29	0,01	3,23	0,14	1,26	0,01	1,00	0,00
81	1,00	0,01	1,47	0,06	2,97	0,25	1,33	0,04	1,00	0,00
90	1,14	0,06	1,32	0,01	3,61	0,04	1,24	0,02	1,00	0,00
111	1,00	0,00	1,31	0,09	3,17	0,24	1,74	0,02	1,00	0,00
161	1,14	0,01	1,28	0,01	3,36	0,12	1,25	0,01	1,00	0,00
166	1,00	0,00	1,34	0,08	3,36	0,02	1,28	0,02	1,00	0,00
364	1,06	0,11	1,26	0,01	3,25	0,08	1,24	0,04	1,00	0,00
387	-	-	1,37	0,12	3,26	0,04	1,00	0,00	-	-
564	1,29	0,08	1,40	0,04	2,94	0,08	1,32	0,02	1,00	0,00
584	1,01	0,01	1,27	0,06	3,33	0,06	1,50	0,13	1,00	0,00

Os valores representam a média de três repetições. A degradação de carboximetilcelulose, xilana, pectina (pH 5), pectina (pH 7) e amido indica a produção, respectivamente, de: endoglicanase, xilanase, poligalacturonase, pectina liase e amilase. Valores de índice enzimático superiores a 1 indicam a degradação do substrato.

Com relação à amplificação do gene *hph*, todas as 11 linhagens foram confirmadas quanto à presença desse gene, em comparação com a linhagem parental (dados não mostrados). Os resultados exibidos nas Figuras 1 e 2 mostraram que a amplificação das regiões flanqueadoras do T-DNA com os iniciadores degenerados AD1, AD2 e AD3 foi mais eficiente na reação secundária de TAIL-PCR, com amplificação positiva para sete linhagens.



**Figura 1.** Resultado de análise de TAIL-PCR para os transformantes 67, 80, 90 e 111. Para cada linhagem foi realizada a reação primária, secundária e terciária para os primers degenerados AD1, AD2 e AD3.



**Figura 2.** Resultado da análise de TAIL-PCR para os transformantes 161, 364, 378 e 564. Para cada linhagem foi realizada a reação primária, secundária e terciária para os primers degenerados AD1, AD2 e AD3.

## Conclusões

A partir da análise de sequenciamento dos produtos da TAIL-PCR clonados, conclui-se que as regiões amplificadas não flanqueiam o T-DNA. É necessário realizar a TAIL-PCR com outros iniciadores degenerados para identificar e analisar a sequência de T-DNA determinando-se os genes envolvidos na desconstrução de polissacarídeos nessa espécie de fungo.

## Agradecimentos

Rebeca Felix agradece por todo o conhecimento proporcionado pela pesquisa e à sua orientadora, Léia Fávaro.

## Referências

- FAVARO, L. C. de L. **Diversidade e interação de *Epicoccum spp.* com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291 f. il. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. O uso de meios sólidos para a detecção de produção de enzimas por fungos. *Micologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.
- LIU, Y. G.; WHITTIER, R. F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, v. 25, n. 3, p. 674-681, 1995.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. Novas melhorias para o etanol lignocelulósico. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 173-180, 2001.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.

SHIMIZU, A. M. F. ; JARAMILLO, P. M. D. ; MIDORIKAWA, G. E. O. ; SILVA, A. S. ; BON, E. P. S; FAVARO, L. C. de L. Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* do fungo celulótico *Trichoderma harzianum* CFAM422 e obtenção de uma biblioteca de transformantes. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 2., 2015, Brasília, DF. **Anais ... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia**, 2015. p. 45-47.