

Determinação de agente seletivo para seleção de transformantes de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422

Elisa Zaparoli Ramos¹, Jhessica Couto Araújo², Gláucia Emy Okida Midorikawa³, Ayla Santana da Silva⁴, Leda Maria Fortes Gottschalk⁵, Léia Cecília de Lima Fávaro⁶, Elba Pinto da Silva Bon⁷

Resumo

O uso de materiais lignocelulósicos mostrou ser uma ótima oportunidade para o desenvolvimento industrial sustentável. Entretanto para que a degradação dos polissacarídeos desses materiais em açúcares fermentescíveis, que ocorre naturalmente no meio ambiente, se transforme em um processo industrial, são necessárias misturas enzimáticas altamente eficientes e de baixo custo. Nesse contexto, fungos celulolíticos do gênero *Trichoderma* têm sido intensamente estudados, usando técnicas de engenharia genética, para o aumento da secreção de enzimas degradadoras dos polissacarídeos da biomassa. Os estudos de transformação genética de fungos incluem o uso de genes marcadores seletivos que conferem ao microrganismo resistência, por exemplo, a compostos antifúngicos, possibilitando a seleção de linhagens modificadas geneticamente. Embora esse seja um tema muito estudado, linhagens diferentes apresentam respostas individualizadas em relação a esses compostos, sendo necessários estudos para a determinação do agente seletivo mais eficiente para um dado microrganismo. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo avaliar a sensibilidade do fungo *Trichoderma lentiforme* (linhagem CFAM-422) a diversos compostos antifúngicos visando determinar agentes seletivos adequados para futuros experimentos de transformação. Entre os diversos compostos antifúngicos avaliados, em concentrações variadas, o herbicida glufosinato (Lybert) e o ácido 5-Fluorítico monohidratado (5-fluoritic acid monohydrate – ácido 5-FOA) inibiram completamente o crescimento do fungo na concentração de 2.000 µg/mL. Esses compostos serão utilizados para a seleção de transformantes de *Trichoderma lentiforme* modificados geneticamente visando ao aumento da sua capacidade celulolítica, em relação à linhagem selvagem CFAM-422.

Palavras-chave: *Trichoderma lentiforme*. transformação genética. método de seleção.

¹ Biotecnologista, mestranda em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, elisa.ramos@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, pesquisadora colaboradora da Embrapa Agroenergia, couto.jhessica2011@gmail.com

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pós-doc na Embrapa Agroenergia, glauciaemy@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora na Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Bioquímica, pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia, ayla.santana@int.gov.br

⁶ Engenheira Química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, leda.fortes@embrapa.br

⁷ Bióloga, doutora em Engenharia Bioquímica, professora titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, elba1996@gmail.com

Introdução

A abundância da biomassa lignocelulósica e o crescente interesse pelo uso de xaropes de biomassa como insumos para a produção de biocombustíveis e produtos químicos de forma sustentável têm impulsionado o desenvolvimento da hidrólise enzimática dos polissacarídeos desses materiais. Nesse contexto, a prospecção e o desenvolvimento de linhagens fúngicas com alta expressão de celulases, xilanases e outras enzimas e proteínas acessórias são de importância fundamental. Paralelamente aos estudos de prospecção de linhagens produtoras, avançaram os estudos da expressão gênica em microrganismos que produzem enzimas relacionadas à degradação desses materiais (ZAMPIERI, 2015; HAMRE et al., 2015).

Os microrganismos do gênero *Trichoderma* têm uma grande importância industrial, sendo um dos mais utilizados para a produção de enzimas celulolíticas, pesticidas e também como agentes de controle biológico (MUKHERJEE et al., 2013; LIU; YANG, 2005). Dentre as espécies de *Trichoderma*, o *T. harzianum*, mostrou-se um bom produtor de um complexo celulolítico bem equilibrado em termos das atividades de endoglucanases e β -glicosidases (CASTRO, 2010a). Apesar disso, para a conversão efetiva do material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis, ainda são necessárias misturas enzimáticas de mais de um gênero de microrganismo, porém a sinergia entre os diferentes grupos de celulases produzidos por culturas puras é, muitas vezes, melhor do que o observado extrato de coculturas. Dessa maneira, é necessário aplicação de técnicas moleculares para obtenção de um microrganismo capaz de produzir um extrato enzimático para a realização de uma hidrólise altamente eficiente e de baixo custo (CASTRO, 2010b).

De modo geral, para que seja possível a obtenção de transformantes, é necessário utilizar estratégias de seleção, como as baseadas na seleção de um composto tóxico apenas para a cepa selvagem. As células mutantes que não possuem a capacidade de formar o composto tóxico crescerão na presença do precursor inerte (AVALOS et al., 1989; BOEKE et al., 1987). Os marcadores de seleção dominantes, tais como resistência a compostos antifúngicos, são os mais adequados, porém escassos (SIGL et al., 2010). Entre os marcadores mais utilizados, está o gene *hph* de *Escherichia coli*. Sua utilidade é ampla, pois o agente seletivo correspondente (higromicina B) é tóxico para cepas de tipo selvagem de muitos fungos e a seleção costuma ser inequívoca (STRAUBINGER et al., 1992). Outro método comum é a utilização do ácido 5-FOA para a seleção de células auxotróficas (Ura^-) em meio a uma população de células prototróficas (Ura^+). A seleção é efetiva em estudos de transformação e recombinação, em que a perda de URA^+ é desejada para obter mutantes auxotróficos (BOEKE et al., 1987). No entanto, a sensibilidade de cada espécie e de cada linhagem é diferente em relação ao reagente e sua concentração.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo selecionar agentes seletivos efetivos, adicionados ao meio de cultivo, para estudos futuros de modificações genéticas de *Trichoderma lentiforme* (linhagem CFAM-422), visando ao aumento da sua capacidade celulolítica.

Metodologia

Obtenção e Propagação do Microrganismo

A linhagem CFAM-422 (*T. harzianum*) foi selecionada por Souza et al. (2011) dentre várias linhagens isoladas da Amazônia. Essa linhagem se encontra preservada na coleção de “Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia (Brasília, DF). A propagação da linhagem foi efetuada por cultivo em placas de Petri contendo o meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*). A preservação da linhagem foi feita pelo método de Castellani (1967): foram cortados discos de uma cultura esporulada em placa de Petri e colocados em frascos com água destilada estéril que foram mantidos à temperatura ambiente. Os conídios foram obtidos por meio da raspagem das placas com solução de Tween 80 (0,1%).

Teste de sensibilidade

A linhagem CFAM-422 de *Trichoderma lentiforme* foi avaliada quanto à sensibilidade a diversos agentes antifúngicos por meio da inibição do crescimento em meio mínimo conforme Pontecorvo et al. (1953). Placas de petri (60x15 mm) com esse meio foram preparadas contendo oito diferentes antifúngicos em diversas concentrações, sendo estas: 10, 20, 50 e 100 ($\mu\text{g/mL}$) para blasticidina ; 50, 75, 100, 200, 500 e 1.000 ($\mu\text{g/mL}$) para neomicina, zeocina e gentamicina; 100, 200, 400, 800 e 1000 ($\mu\text{g/mL}$) para carbenicilina; 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000 ($\mu\text{g/mL}$) para ácido 5-FOA; 50, 100, 200, 500, 1000 e 2.000 ($\mu\text{g/mL}$) para herbicida glufosinato; 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000, 5000 ($\mu\text{g/mL}$) para acetamida. Uma solução de esporos (conídios) foi preparada por meio da raspagem de uma placa de PDA contendo o microrganismo esporulado (após 7 dias de cultivo) em 5 mL de Tween 80 0,1%. Dessa solução, 5 μL foram plaqueados no centro de cada placa preparada nas condições descritas acima. As placas foram incubadas a 28 °C e avaliadas quanto ao crescimento em comparação com o controle (meio de cultura sem o agente seletivo).

Resultados e discussão

A partir da medida de diâmetros de crescimento da colônia das placas, foi possível avaliar a sensibilidade do microrganismo a cada antifúngico e ao ácido 5-FOA. Na Figura 1, foram mostradas algumas concentrações como padrão de comparação, as concentrações omitidas mantiveram o padrão de crescimento das placas anteriores. Para a blasticidina, neomicina, zeocina, gentamicina e acetamida, a linhagem CFAM-422 apresentou certa sensibilidade nos primeiros dias de crescimento, porém, após o quinto dia o microrganismo cresceu ocupando toda a placa (60 mm). Em relação à acetamida, não houve diferença do crescimento do controle para qualquer concentração testada do reagente, na faixa de 50 $\mu\text{g/mL}$ até 5000 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados indicam que a linhagem selvagem tem uma resistência natural a esses compostos, até mesmo em concentrações mais altas.

Como observado, a partir da concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido 5-FOA e herbicida glufosinato, não houve desenvolvimento da linhagem CFAM-422. Isso indica que, a partir dessas concentrações, esses compostos se tornaram tóxicos à cepa selvagem, causando a total repressão de seu crescimento. Dessa forma, quando

utilizados como método de seleção, apenas os mutantes que obtiverem o gene de resistência irão crescer sobre o meio, permitindo a seleção e distinção dos transformantes perante a cepa selvagem.

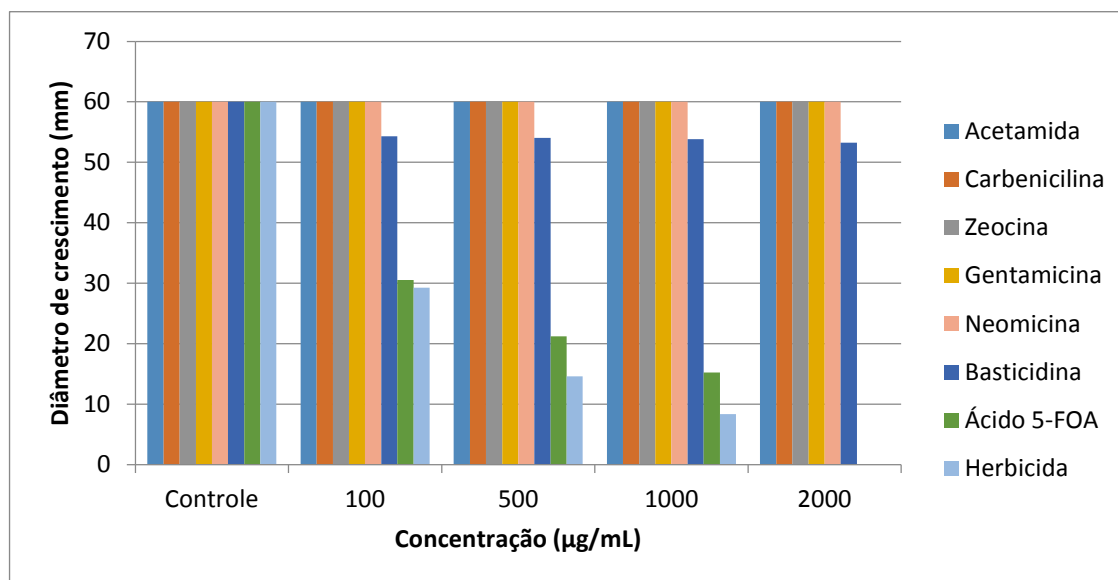


Figura 1. Sensibilidade da linhagem CFAM-422. O gráfico apresenta o diâmetro de crescimento das colônias em relação às diversas concentrações dos reagentes acetamida, carbenicilina, zeocina, gentamicina, blastacidina, ácido 5-FOA e herbicida glufosinato, após 7 dias de incubação.

Conclusões

A linhagem CFAM-422 apresentou resistência natural aos antifúngicos blastacidina, neomicina, zeocina, gentamicina e acetamida, excluindo a possibilidade de utilização desses reagentes como agentes seletivos. No entanto, concentrações a partir de 2.000 µg/mL do ácido 5-FOA e do herbicida glufosinato resultaram na total inibição do crescimento da cepa. Como cada linhagem reage de maneira diferente a cada agente e concentração, é necessário verificar e determinar um agente seletivo eficaz. Nesse caso, foi descoberta a sensibilidade da cepa CFAM-422 para o herbicida glufosinato e o ácido 5-FOA nas concentrações de 2.000 µg/mL. Dessa maneira, esses compostos poderão atuar como potenciais agentes seletivos para futuros experimentos de transformação genética dessa linhagem.

Agradecimentos

À Embrapa Agroenergia e ao Laboratório Bioetanol IQ-COPPE/ UFRJ.

Referências

AVALOS, J.; GEEVER, R. F.; CASE, M. E. "Bialaphos Resistance As A Dominant Selectable Marker In *Neurospora Crassa*". **Current Genetics**, v. 16, n. 5-6, p. 369-372, 1989.

BOEKE, J. D.; TRUEHEART, J.; NATSOULIS, G.; FINK, G. R. 5-Fluoroorotic Acid As A Selective Agent In Yeast Molecular Genetics. **Methods in Enzymology**, v. 154, p. 164-175, 1987.

- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.
- CASTRO, A. M.; FERREIRA, M. C.; DA CRUZ, J. C.; PEDRO, K. C. N. R.; CARVALHO, D. F.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. High-Yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. **Enzyme Research**, article ID 854526, 2010a.
- CASTRO, A. M.; PEDRO, K. C. N. R.; DA CRUZ, J. C.; FERREIRA, M. C.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant B-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 2111-2122. 2010b.
- HAMRE, A. G.; EIDE K. B.; WOLD H. H.; SØRLIE, M. Activation of enzymatic chitin degradation by a lytic polysaccharide monoxygenase. **Carbohydrate Research**, v. 407, p. 166-169, 2015.
- MUKHERJEE, P.; HORWITZ, B. A.; ESTRELLA, A. H.; SCHMOLL, M.; KENERLEY C. M. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 105-129, 2013.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine**, v. 5, p.141-238, 1953.
- SOUZA, M. F.; GONÇALVES, H. R. A.; FERNANDES, O. C.; BOM E. P.; SILVA, A. S. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos filamentosos isolados da Amazônia: seleção de uma linhagem promissora. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 18., 2011, Caxias do Sul. [Anais...]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011.
- STRAUBINGER, B.; STRAUBINGER E.; WIRSEL, S.; TURGEON, G.; YODER, O. Versatile fungal transformation vectors carrying the selectable bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*. **Fungal Genetics Reports**, v. 39, n. 1, p. 82-83, 1992.
- ZAMPIERI, D. **Expressão gênica e atividade de celulases, β-glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29**. 2015. 236 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.