



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Expressão diferencial de genes associados à degradação
enzimática e destoxificação da torta de pinhão-manso em
*Pleurotus pulmonarius***

Taísa Godoy Gomes

Orientador: Prof. Robert Neil Gerard Miller, Ph.D.
Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

Brasília-DF

2019

Táisa Godoy Gomes

**Expressão diferencial de genes associados à degradação
enzimática e destoxificação da torta de pinhão-manso em *Pleurotus
pulmonarius***

Tese apresentada à Universidade de
Brasília como requisito para a
obtenção do título de Doutor em
Biologia Molecular pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Drº Robert Neil Gerard Miller

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2019**

Dedico:

Ao professor Doutor Félix Gonçalves de Siqueira e ao professor Doutor Robert Miller. Á vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, sem ELE jamais teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço também a minha família: Zélia, Daniel, Larissa, Sámed e Donnie. São as pessoas mais importantes da minha vida, por quem eu luto e busco vencer sempre.

Agradeço ao Drº Félix Siqueira pela oportunidade única de trabalhar nesse projeto e quem me abriu as portas da Embrapa Agroenergia.

Agradeço ao professor Drº Rob, pela orientação impecável durante os 4 anos de doutoramento, pela dedicação, incentivo e ensinamento. O senhor é meu exemplo como profissional e sou eternamente grata pela confiança e oportunidade de poder desfrutar da UnB e do Laboratório Interação Planta Praga.

Agradeço ao Drº Gabriel Alves por toda a ajuda, conselhos e sugestões, que foram fundamentais durante todo o desenvolvimento dessa tese. Serei eternamente sua fã.

Agradeço ao pessoal do Laboratório Interação Planta Praga: Tati, Érica, Michelle, Djair, Clemente especialmente ao Fernando Fonsenca por toda a ajuda. São pessoas especiais ao qual eu tenho um carinho imenso.

Agradeço ao meus amigos Joice, Rúben, Aparecido e Nelma por todo os momentos compartilhados.

Agradeço a Drª Simone Mendonça por todo apoio e confiança para desenvolver esse trabalho.

Agradeço a toda equipe da Embrapa Agroenergia por toda ajuda e contribuições ao longo desse trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Bioinformática da Embrapa Cenargen, em especial ao Marcos Mota.

Agradeço ao professor Carlos André, Wagner Fontes e Mariana Castro pelo apoio e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

*” It's amazing with the blink of an eye you finally see
the light.
It's amazing when the moment arrives that you know
you'll be alright”*

(Amazing, Aerosmith)



Lista de tabelas

Table 1. Comparison of Physical, Chemical, and Biological Methods for Degradation of Phorbol Esters	29
Tabela 2. Resumo do delineamento experimental para a análise do transcrito de <i>P. pulmonarius</i> . 3DAI – 3 dias após inoculação; 7DAI – 7 dias após inoculação; 11DAI – 11 dias após inoculação; B1 – bioensio 1; B2 – bioensio 2; T – torta de pinhão- manso tóxico; NT – torta de pinhão-manso atóxica.....	77
Tabela 3. Dez genes alvo usados na validação dos genes de referência de <i>P. pulmonarius</i> cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica.	80
Tabela 4. Genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol selecionados para validação de expressão por RT-qPCR.....	82
Tabela 5. Dados do sequenciamento via Illumina Hiseq 2500.....	88
Tabela 6. Unigenes de diferentes basidiomicetos obtidos por sequenciamento de alto rendimento (RNA-seq) e montados de novo (<i>de novo assembly</i>).	88
Tabela 7. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) no cultivo de <i>P. pulmonarius</i> em torta de pinhão-manso tóxica em comparação com atóxico, durante o 3º dia de cultivo (3 DAI).....	97
Tabela 8. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) no cultivo de <i>P. pulmonarius</i> em torta de pinhão-manso tóxica em comparação com atóxico, durante o 7º dia de cultivo (7 DAI).....	103
Table 9. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) no cultivo de <i>P. pulmonarius</i> em torta de pinhão-manso tóxica em comparação com atóxico, durante o 11º dia de cultivo (11 DAI).....	107
Tabela 10. Proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol por <i>P. pulmonarius</i> expressas em todos os tempos de cultivo analisados.	130
Tabela 11. Proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol por <i>P. pulmonarius</i> expressas em 7DAI e 11DA.....	130

Lista de figuras

- Figura 1.** Fluxograma ilustrando a integração da cadeia produtiva do biodiesel, fungicultura (cogumelos comestíveis) e indústria de processamento de insumos para ração animal. _____ 21
- Figura 2.** Chemical structures of the phorbol esters C1–C6. Adapted from ref 25 _____ 26
- Figura 3.** Summary of inflammatory responses induced by phorbol esters. Adapted from ref 21. _____ 28
- Figura 4.** Limitations, advantages, and disadvantages in methods for degradation of phorbol esters in *Jatropha curcas* cake. _____ 30
- Figura 5.** Applications of crop byproducts that offer added value to the planting of *Jatropha curcas*. _____ 33
- Figura 6.** Degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* ao longo de 30 dias de cultivo. Concentrações abaixo da linha vermelha são consideradas atóxicas _____ 54
- Figura 7.** Degradação dos ésteres de forbol e atividade enzimática de *P. pulmonarius* ao longo de 30 dias de cultivo em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica. O Gráfico A mostra os resultados da quantificação de enzimas oxidativas em substrato tóxico e o gráfico B no substrato atóxico (sem éster de forbol). Os gráficos C e D mostram a quantificação de proteases em substrato tóxico e atóxico, respectivamente. _____ 56
- Figura 8.** Quantificação de holocelulases ao longo de 30 dias de cultivo do fungo *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica. _____ 57
- Figura 9.** Controles externos aplicados a degradação dos ésteres de forbol. Controle 1- Torta de pinhão-manso autoclavada 20 min; Controle 2- Torta de pinhão-manso autoclavada + água; Controle 3- Torta de pinhão-manso autoclavada + água sob agitação; Controle 4- Torta de pinhão-manso autoclavada + azida sódica; Controle 5- Torta de pinhão-manso autoclavada + azida sódica sob agitação. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade _____ 59

Figura 10. Influência do tratamento físico (autoclave), químico (azida sódica) e enzimático frente a degradação dos ésteres de forbol, presentes na torta de pinhão-manso. Controle 1- Torta de pinhão-manso autoclavada 20 min; Controle 2- Torta de pinhão-manso autoclavada + água; Controle 3- Torta de pinhão-manso autoclavada + azida sódica sob agitação. Extrato bruto 1: Extrato enzimático bruto (sem adição de azida sódica) obtido do cultivo de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica; Extrato bruto 2: Extrato enzimático bruto (sem adição de azida sódica) obtido do cultivo de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso atóxica; Extrato bruto 3: Extrato enzimático bruto (sem adição de azida sódica) obtido do cultivo de *P. pulmonarius* em meio sintético BDA. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

_____	60
Figura 11. Fluxograma geral da metodologia usada no presente trabalho.____	74
Figura 12. Esquema ilustrativo do desenho experimental usado para o RNA-seq de <i>P. pulmonarius</i> ._____	76
Figura 13. Diagrama de Venn, resumindo números de DEGs identificados nos tempos de cultivo 3, 7 e 11 DAI. A região de sobreposição do diagrama representa DEGs em comum nos cultivos de <i>P. pulmonarius</i> . A: Diagrama de Venn Global; B: Diagrama de Venn de comparativo dos dias analisado com DEGs reprimidos e superexpressos. _____	90
Figura 14. Total de sequências anotadas e mapeadas por Blast2GO pelo banco de dados INTERPRO para o transcrito do <i>P. pulmonarius</i> cultivado em torta tóxica e atóxica de pinhão-manso._____	92
Figura 15. Número de sequências referentes a grupos enzimáticos identificados durante o crescimento de <i>P. pulmonarius</i> em torta de pinhão-manso. _____	92
Figura 16. Ilustração das categorias de GO enriquecidos em 3DAI de <i>P. pulmonarius</i> cultivado em torta de pinhão-manso._____	93
Figura 17. Ilustração das categorias de GO enriquecidos em 7 DAI de <i>P. pulmonarius</i> cultivado em torta de pinhão-manso._____	94
Figura 18. Ilustração das categorias de GO enriquecidos em 11DAI de <i>P. pulmonarius</i> cultivado em torta de pinhão-manso._____	95

Figura 19. Heatmap dos genes diferencialmente expressos em *P. pulmonarius* durante 11 dias de cultivo em torta de pinhão-manso. A expressão gênica diferencial após o cultivo em torta tóxica foi relativo ao cultivo em torta atóxica.

_____ 96

Figura 20. Genes em comum que estão diferencialmente expressos pelo basidiomiceto *P. pulmonarius* nos três momento analisados (3DAI, 7DAI e 11DAI). _____ 128

Figura 21. Genes em comum que estão diferencialmente expressos pelo basidiomiceto *P. pulmonarius* em 7 e 11DAI. _____ 128

Figura 22. Níveis de expressão relativa dada pela razão entre os tratamentos T e NT dos genes que codificam para hidrofobinas, que são proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico ___ 132

Figura 23. Níveis de expressão relativa dada pela razão entre os tratamentos T e NT dos genes que coficam monooxigenases do citocromo P450, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico. _____ 133

Figura 24. Níveis de expressão relativa dos genes que coficam para thiolase, metalloprotease e esterase, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico. _____ 134

Figura 25. Níveis de expressão relativa dos genes que coficam para Succinate dehydrogenase, Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase, flavin reductase, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico. _____ 135

Figura 26. Níveis de expressão relativa dos genes que coficam para alpha-xylosidase e β -glucuronidase, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico. _____ 136

Figura 27. VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condiçãoe. 0=T ;1=NT. A -9DAI; 12DAI. _____ 139

Figura 28. PLS-DA 3D mostrando agrupamento de replicatas e diferenciação entre condições. Na legenda da imagem, os grupos 0 e 1 correspondem a T e NT. A- 9DAI; B-12DAI. _____ 140

Figura 29. Mapa de correlações entre o conjunto completo de proteínas analisadas mostrando a razão entre as abundâncias relativas normalizadas de cada proteína regulada. Tons de vermelho indicam correlação positiva, tons de azul, correlação negativa. A-9DAI; B-12DAI VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições. 0=T ;1=NT. A -9DAI; 12DAI. _____ 141

Figura 30. Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições após a segunda etapa de análises estatísticas. O conjunto completo das proteínas reguladas atendeu ao fator limitante do agrupamento das replicatas em cada condição. A- 9 DAI; B-12 DAI. _____ 142

Figura 31. Agrupamento das proteínas em vias. Duas vias contendo proteínas reguladas detectadas pelas plataformas Blast2GO e BlastKoala A-C: ____ 144

Figura 32. Distribuição geral de termos GO dentre as proteínas reguladas em 9DAI por *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso. A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celulares _____ 147

Figura 33. Distribuição geral de termos GO dentre as proteínas reguladas em 12DAI por *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso. A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celular. _____ 150

Figura 34. A-C: Agrupamento semântico das proteínas reguladas em 9DAI (eixos x e y), correlação com frequência absoluta no conjunto de proteínas (tamanho dos círculos) e similaridade com outros termos (escala de cores). A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celulares _____ 153

Figura 35. A-C: Agrupamento semântico das proteínas reguladas em 12DAI (eixos x e y), correlação com frequência absoluta no conjunto de proteínas (tamanho dos círculos) e similaridade com outros termos (escala de cores). A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celulares 155

Figura 36. Modelo proposto por Takahashi et al. (2005) entre a interação entre polyesterase CutL1 e a proteína hidrofóbica RolA para degradação do

polímero PBSA Modelo proposto para as etapas de degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius*. _____ 169

Figura 37. Modelo proposto para as etapas de degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* _____ 171

Lista de Abreviaturas

PM- Pinhão-manso

TSPM- Torta de semente de pinhão-manso

WRF- Inglês, *White-rot fungi*. Português, fungos de podridão branca.

SMS – Inglês, *Spent Mushroom Substrate*. Português (tradução livre) *Biomassa Pós-cultivo de cogumelos comestíveis*

C/N – Relação Carbono Nitrogênio

g – Gramas

mm – Milímetros

mL – Mililitros

µL – Microlitros

mg – Miligramas

nm – nanômetro

mM – Milimolar

rpm – Rotação por Minuto

UV - Ultra violeta

h- Horas

MnP- manganês peroxidase

EFs- ésteres de forbol

T- Tóxico

NT-Não tóxico

DAI- Dias de inoculação

NGS- Next Generation Sequencing

DEG- Differentially expressed gene/ Gene diferencialmente expresso

GO- Gene Ontology

Kegg- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

RT-qPCR- PCR em tempo real quantitativa

EC- Enzyme Commission Numbers

SUMÁRIO

1. Resumo	xvi
2. Abstract	xvii
3. I.Introdução geral.....	18
4. 2. Objetivos da tese	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
5. 3. Estrutura da tese	24
Capítulo I	
6. INTRODUCTION	26
7. AUTHOR INFORMATION	34
8. ACKNOWLEDGMENTS	34
9. Resumo	xi
10. Abstract	xli
11.1.Introdução.....	42
12.2.Objetivos do capítulo	46
2.1 Objetivos específicos do capítulo	46
13.3.Metodologia	47
3.1 Cultivo de <i>P. pulmonarius</i> EF-88 em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica	47
3.2 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos.....	47
3.3. Determinação dos Açúcares Redutores - DNS.....	48
3.4. Determinação das atividades de holocelulases	48
3.5. Atividades de proteases	49
3.6. Lacases	50
3.7. Atividade de Lignina peroxidase.....	50
3.8. Manganês peroxidases.....	51
3.9. Atividade esterase e lipase.....	51
3.10 Extração metanólica de éster de forbol e quantificação via HPLC	52

3.11. Cultivo sólido de <i>P. pulmonarius</i> EF-88 em diferentes fontes de carbono e obtenção do extrato bruto enzimático	52
3.12 Biodegradação enzimática dos ésteres de forbol	53
14.4. Resultados	54
4.1. Degradação dos ésteres de forbol pelo basidiomiceto <i>P. pulmonarius</i> ao longo de 30 dias de cultivo estado sólido	54
4.2. Quantificação das atividades enzimáticas de <i>P. pulmonarius</i> cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica	55
.....	57
4.3. Degradação de ésteres de forbol por extratos enzimáticos brutos de <i>P. pulmonarius</i> EF88 obtidos em diferentes fontes de carbono	58
15.5. Discussão	61
5.1 Degradação dos ésteres de forbol ao longo de 30 dias.....	61
5.2. Atividades enzimáticas associadas a degradação de ésteres de forbol.....	63
16.6. Conclusões	66
Capítulo III	
17. Resumo	69
18. Abstract	70
19.1. Introdução	71
20.2. Objetivo	73
2.1 Objetivos específicos do capítulo	73
21.3. Metodologia	74
3.1 <i>P. pulmoraius</i> EF88 e condições de cultivo	75
3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	75
3.4 Avaliação da qualidade das sequências e filtragem dos dados.....	78
3.5 Mapeamento dos <i>reads</i> e identificação dos transcritos	78
3.6 Análise quantitativa da expressão gênica.....	78
3.7 Anotação das sequências.....	79
3.8. Validação dos genes de referência.....	79
3.9. Desenhos dos <i>primers</i> para validação dos genes de referência ..	80
3.10 <i>Real-time qPCR</i>	80
3.11 Estabilidade de expressão e análise de expressão relativa dos genes de referência	81

3.12 Validação dos genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol.....	82
3. 13 Secretoma global.....	84
3.13.1 Cultivo de <i>P. pulmonarius</i> EF-88 em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica	84
3.13. 2 Obtenção dos extratos proteicos bruto e preparo das amostras ...	84
3.13.3 Análise por LC-MS-MS	85
3.13.4 Análise de dados	86
22. Análise qualitativa.....	87
3.13.5 Análise quantitativa.....	87
23.4. Resultados.....	88
4.1 Expressão diferencial de genes do macro-basidiomiceto <i>P. pulmonarius</i> EF88 cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica	88
4.2 Validação genes candidatos a degradação de ésteres de forbol	131
4.3 Secretoma global e análise proteômica do <i>P. pulmonarius</i>	137
4.4 Gene Ontology e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ..	143
24.5. Discussão	156
5.1 Análise Gene Ontology (GO)	156
5.2 Metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas.....	157
5.3 Influência da molécula tóxica de éster de forbol na expressão diferencial de genes em <i>P. pulmonarius</i> EF88	158
5.4 Mecanismo de proteção: Heat Shock protein e Hidrofobinas	159
5.5 Genes e proteínas do EF88 envolvidos na degradação dos ésteres de forbol presentes na torta do pinhão-manso	161
5.5.1 Hidrolases de ésteres carboxílicos	161
5.5.2 Metaloprotease	162
5.5.3. Os genes do Citocromo P450	164
5.5.4 Proteínas hidrofobinas	166
25.6. Conclusões.....	172
26.7. Conclusões finais da tese	173
27.8. Referencial da literatura.....	174
28.8. Anexo 1: Propriedade intelectual.....	183

Resumo

A biodestoxificação da torta de pinhão-manso oferece vantagens sobre outros métodos de destoxificação em termos de eficiência, custo e potencial para desenvolvimento de produtos secundários. No entanto, apesar de todas essas vantagens ainda não foi elucidado o mecanismo envolvido (genes, proteínas e vias metabólicas) nesse processo de biodegradação dos EFs por micro-organismo. No cenário de biodestoxificação, o macro-basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* EF-88 degrada com eficiência esse composto e ainda produz cogumelos comercialmente viáveis. O presente estudo foi conduzido com a finalidade de identificar genes e mecanismos celulares envolvidos no processo de destoxificação da torta de pinhão-manso. E para isso, ferramentas transcritômicas (RNA-seq) e proteômicas (LC-MS-MS) foram utilizadas. A degradação dos EFs ao longo do cultivo sólido foi usada como parâmetro para determinar os pontos críticos para análise transcritômica e proteômica. O transcritoma do *P. pulmonarius* EF88 foi montado usando a estratégia *de novo* e foram mapeados um total de 23297 genes. O cultivo do basidiomiceto *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica revelou um total de 351 DEGs (genes diferencialmente expressos) dos quais 234 estavam superexpressos e 117 reprimidos. As análises proteômicas quantitativas mostraram que 23 proteínas estavam moduladas em 9DAI e 40 proteínas em 12DAI. De acordo com os resultados obtidos em ambas estratégias foi possível estabelecer um modelo de degradação dos EFs por *P. pulmonarius*: Proteínas hidrofobinas atuam no recrutamento de esterases e metaloproteases, que por sua vez hidrolisam as ligações C-13 e C-16 dos EFs, os produtos secundários formados na hidrólise inicial são oxidados por monooxigenases P450. Complexos proteicos formados por hidrofobinas e enzimas hidrolíticas (esterase e metaloprotease) podem aumentar a eficiência de degradação dos EFs presentes na torta de pinhão-manso. Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem os primeiros resultados a nível molecular envolvidos na biodestoxificação dos EFs por micro-organismos, e podem ser usados para solucionar alguns gargalos relacionados a biodegradação dos ésteres de forbol, como tempo de cultivo e dificuldade de escalonamento.

Palavras-chave: Basidiomiceto, pinhão-manso, éster de forbol, degradação, tóxico, RNA-seq, LC-MS-MS, metaloprotease, hidrofobina.

Abstract

The biodegradation of phorbol esters (PEs) in jatropha cake offers advantages over other approaches for detoxification in terms of efficiency, cost and the potential for development of secondary products. However, despite these advantages, the mechanisms (genes, proteins and metabolic pathways) involved in the biodegradation of PEs by microorganisms has not yet been elucidated. In this context, the macrobasidiomycete *Pleurotus pulmonarius* EF-88 both enables efficient degradation of PEs and production of commercially viable mushrooms. This study was conducted to identify genes and the cellular mechanisms involved in the detoxification of PEs in jatropha cake. To this end, transcriptional (RNA-seq) and proteomic (LC-MS-MS) approaches were employed. The degradation of PEs throughout solid culture was used as a parameter to determine the critical points for transcriptomic and proteomic analysis. The *P. pulmonarius* EF88 transcriptome was assembled using a *de novo* strategy, with a total of 23297 unigenes identified. Cultivation of *P. pulmonarius* in toxic jatropha cake revealed a total of 351 differentially expressed genes (DEGs), of which 234 were overexpressed and 117 repressed. Quantitative proteomic analyzes showed that 23 proteins were modulated 9 DAI and 40 proteins 12 DAI. According to the results obtained in both strategies, it was possible to establish the following model of degradation of PEs by *P. pulmonarius*: Hydrophobin proteins act in the recruitment of esterases and metalloproteases and these enzymes hydrolyze the C-13 and C-16 bonds of PEs. The secondary products formed in the initial hydrolysis are oxidized by P450 monooxygenases. Protein complexes formed by hydrophobins and hydrolytic enzymes (esterase and metalloprotease) may increase the degradation efficiency of PEs present in jatropha cake. The results obtained in this work provides the first insights into the mechanisms, at the molecular level, involved in the biodegradation of PEs by microorganisms and will be applicable to addressing difficulties related to phorbol ester biodegradation such as culture duration and scaling.

Keyword: Basidiomycete, *Jatropha Curcas*, phorbol ester, degradation, toxic, RNA-seq, LC-MS-MS, metalloprotease, hydrophobin.

I. Introdução geral

O pinhão-manso ou *Jatropha curcas* é uma oleaginosa pertencente à família das Euforbiáceas, trata-se de uma espécie perene, de crescimento rápido e pode atingir mais de 5 m em 4 anos. Segundo alguns autores o centro de origem de *J. curcas* seria a América do sul e Central (Abdelgadir et al., 2013; Kumar e Tewari et al., 2015). No entanto, é facilmente disseminada em regiões tropicais e subtropicais e amplamente distribuídas na Ásia, África e Índia (Marques et al., 2008; Laviola et al., 2011; Kumar e Tewari et al., 2015).

O plantio dessa oleaginosa permite recuperar e restaurar áreas com erosão, solos pedregosos e pouco produtivos, além disso, possuem a capacidade de se adaptar em regiões mais secas e com baixo índice pluviométrico (Heller, 1996; Makkar et al., 1997; Kumar e Tewari et al., 2015).

A literatura acadêmica faz referência sobre o grande potencial dessa espécie para produção de biodiesel, sendo considerada umas das culturas mais promissora para esse fim. No entanto, para sua real consolidação são necessários desenvolvimentos agronômicos fundamentais, como diferentes variedades com alta produtividade e homogeneização do tempo de colheita (Laviola e Capdeville, 2013). O pinhão-manso apresenta potencial de rendimento de grãos/óleo superior às oleaginosas tradicionais, como a soja, bem como, características físico-químicas de óleo favoráveis à produção de biodiesel como viscosidade adequada, e ácidos graxos de boa qualidade (Drumond et al., 2010; Gomes et al., 2018).

O óleo presente nas sementes de *J. curcas* são constituídos de ácidos graxos saturados (20%) e insaturados (80%), com média de 34,4% de óleo/grão, que pode ser convertido em biodiesel (Kalagatur et al., 2017). Além disso, os principais constituintes do óleo de pinhão-manso são os ácidos oleico, linoleico e palmítico, e dessa forma substituiria de forma eficiente e adequada o óleo diesel padrão (Ha et al., 2018).

Mesmo não sendo originário do Brasil, o pinhão-manso cresce espontaneamente em diferentes regiões do país. Inicialmente era cultivada

para ser usada como cerca viva para animais e para recuperar solos degradados. Apesar de ser amplamente distribuída, *J. curcas* ainda está em processo de domesticação e existem poucas informações agronômicas sobre essa espécie, dificultando o interesse e a consolidação dessa cultura. Segundo Laviola et al. (2013) a partir do ano de 2006 o plantio de pinhão-manso ganhou força no Brasil, mas a falta de critérios agronômicos aliados a informações errôneas como a não necessidade de controle de pragas e doenças acarretou em abandono dos plantios (Laviola & Capdeville, 2013).

Para Castro et al. (2010) existem pontos tecnológicos, políticos, econômicos, sociais e ambientais que condicionam a solidez de uma matriz energética a nível mundial. Dentre esses pontos podemos destacar a necessidade de implementação de culturas ou empreendimentos que carecem de mão-de-obra, oferecendo oportunidades com viabilidade econômica a agricultura familiar, e geração de energia ou subprodutos com valor agregado a partir dos resíduos oriundos do processo de produção de biocombustíveis. Além disso, torna-se um grande diferencial em termos econômicos e ambientais, o fato da matéria-prima usada para produção de bioenergia não poder ser destinada a alimentação humana, nem causar impactos ambientais negativos, caso contrário, causará desinteresse no apoio político e social.

A cultura do pinhão-manso não é empregada na indústria alimentícia, portanto não concorre com a agricultura de alimentos. Por se tratar de uma planta com pouca exigência hídrica e a produção de grãos ser alta a partir da fase adulta, a fase inicial de estabelecimento permite o plantio consorciado, ou seja, plantio de culturas anuais, especialmente culturas alimentícias, o que seria uma alternativa de renda a mais para o produtor. Trata-se de uma cultura altamente dependente de mão-de-obra já que a maturação de seus frutos acontece de forma desuniforme (Laviola et al., 2011; Saturnino, 2005). Diante desse panorama, *J. curcas* se encaixa nas diretrizes citadas por Castro et al. (2010) e se torna uma alternativa viável para agricultura familiar sustentável e regiões de clima semiárido.

O pinhão-manso ainda não teve sua cadeia produtiva estabelecida, por falta de um sistema de produção agrônomo definido para diferentes regiões do país e também pela falta de agregação de valor ao seu coproduto, a torta, que é tóxica para uso em rações animais (mono e poligástricos). A cadeia de

biodiesel somente integrará outras oleaginosas se os coprodutos tiverem um mercado tão promissor quanto o das cadeias já estabelecidas como a da soja e algodão.

Portanto, um gargalo importante a ser resolvido dessa cadeia produtiva é a destoxificação da torta de pinhão-manso. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos capaz de degradar de forma eficiente os ésteres de forbol, torna-se imprescindível. A literatura descreve alguns processos de destoxificação desse resíduo: química, física, biológica ou processos combinados (Gomes *et al.*, 2018).

O método de biodegradação dos ésteres de forbol é uma estratégia promissora e apresenta vantagens como: i) maior eficiência, ii) menor custo, iii) possível obtenção de outros produtos, que agregaria valor, como cogumelos comestíveis ou enzimas de interesse biotecnológico (lacases, fitases, xilanases e proteases).

A produção e consumo de macrofungos ou macro-basidiomicetos (cogumelos comestíveis), como o *Pleurotus pulmonarius*, cresce a cada ano em nosso país. Assim, há possibilidades de integração desta cadeia de alimentos, com a utilização de um coproduto da cadeia do biodiesel e o uso da biomassa pós-cultivo de cogumelos (SMS – *spent mushroom substrate*) na cadeia de ração animal, tornando assim uma possível solução tecnológica muito atrativa (Figura 1).

O grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia, por meio do projeto de pesquisa “FungiDetox” – CNPq/Embrapa (projeto numero 404786/2013-8), demonstrou que a biodestoxificação da torta de pinhão-manso pelo basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* concomitante a produção de cogumelos comestíveis é possível (Gomes, 2015). A incorporação da torta de pinhão-manso biodestoxificada na alimentação de ratos, comprovou a eficiência do processo de destoxificação por *P. pulmonarius* (dados não publicados). Sendo assim, a torta da semente do pinhão-manso (TSPM) apresenta potencial para ser usada como matéria-prima no cultivo em estado sólido de basidiomicetos de modo a potencializar o seu uso como insumo (aditivo) em ração animal, como tem sido feito nos denominados “DFM – Direct-fed Microbial”, de forma independente a produção de corpos de frutificação.

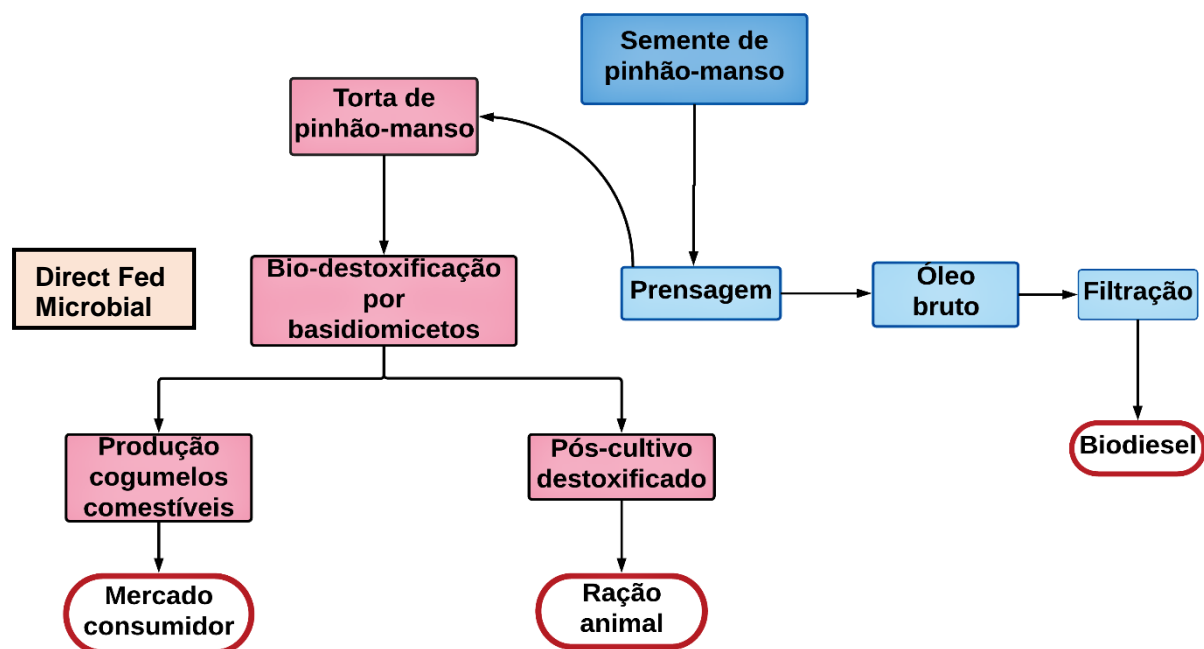


Figura 1. Fluxograma ilustrando a integração da cadeia produtiva do biodiesel, fungicultura (cogumelos comestíveis) e indústria de processamento de insumos para ração animal.

Apesar das vantagens desse bioprocesso, alguns gargalos ainda precisam ser solucionados como: tempo de cultivo e escalonamento. O mecanismo de biodegradação dos ésteres de forbol permanece desconhecido, o que dificulta estratégias como melhoramento genético de cepas, que seria o primeiro passo na tentativa de resolver os gargalos citados.

Dessa forma, o presente trabalho têm como objetivo identificar os genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol pelo basidiomiceto *P. pulmonarius EF88* (Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a biorefinaria da Embrapa Agroenergia - CMMABio) por meio da análise do transcrito via NGS (*Next generation sequencing*) e proteoma via LC-MS-MS.

Este documento foi organizado na forma capítulos, onde: i) O capítulo I trará uma revisão de literatura, sobre os atuais métodos de degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. O tema foi discutido em artigo científico (revisão) publicado com o título “*Current Strategies for the Detoxification of Jatropha curcas Seed Cake: A Review*”, que foi publicado na

revista científica *Journal of agricultural and food chemistry*, em 2018. ii) e iii): refere-se a outros dois capítulos (II e III) que serão descritos os resultados de degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* e a expressão diferencial gênica (transcritômica) juntamente com análises proteômicas do EF88.

2. Objetivos da tese

2.1 Objetivo geral

- Identificar genes e proteínas envolvidos no processo de biodegradação dos ésteres de forbol pelo macro-basidiomiceto *P. pulmonarius EF-88* por meio de abordagens moleculares como transcriptoma e proteoma.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os pontos críticos da degradação dos ésteres de forbol ao longo de 30 dias de cultivo em torta de pinhão-manso por *P. pulmonarius EF-88*;
- Analisar o transcriptoma de *P. pulmonarius EF-88* em resposta ao cultivo em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica e identificar genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol *in silico*;
- Validar a expressão dos genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* via RT-qPCR;
- Analisar o proteoma de *P. pulmonarius EF-88* em resposta ao cultivo em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica e identificar proteínas envolvidas no processo de biodegradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius EF-88*;

3. Estrutura da tese

A presente tese intitulada “Expressão diferencial de genes associados à degradação enzimática e destoxificação da torta de pinhão-manso em *Pleurotus pulmonarius* EF88” será organizada em III capítulos:

Capítulo I: Esta primeira parte traz uma revisão de literatura sobre os principais e atuais métodos de degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. Este *review*, que foi publicado no ano de 2018, tem como título: “*Current Strategies for the Detoxification of Jatropha curcas Seed Cake: A Review*”. Publicado na revista científica *Journal of agricultural and food chemistry*, 2018.

Capítulo II: A segunda parte deste documento versa sobre os resultados relacionados a curva de degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* EF-88 ao longo de 30 dias, em cultivo em estado sólido, com a torta de pinhão-manso como fonte nutricional (carbono/nitrogênio). Os resultados obtidos nesta parte do trabalho foram usados como parâmetros, para analisar os pontos críticos de biodegradação dos EFs pelo EF88, fazendo uso de ferramentas de biologia molecular como as análises transcritômicas e proteômicas. Também foram abordados nesse capítulo resultados voltados a atividades enzimáticas observadas em diferentes momentos do crescimento fúngico nas TSPM (tóxicas e não-tóxicas).

Capítulo III: Na terceira e última atividade deste documento estão listados e discutidos os resultados das análises moleculares (transcritoma, expressão relativa por RT-qPCR e proteoma) e os possíveis mecanismos de biodegradação dos EFs pelo fungo modelo utilizado *P. pulmonarius* EF88.

Capítulo I: Revisão da literatura

Current Strategies for the Detoxification of Jatropha curcas Seed Cake: A Review

Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review

Taisa G. Gomes,[†] Sândi I. A. Hadi,[‡] Gabriel S. Costa Alves,[†] Simone Mendonça,[§] Felix G. De Siqueira,^{*,§} and Robert N. G. Miller^{*,†}

[†]Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

[‡]Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brazil

[§]Embrapa Agroenergia, STN-70297-400, 70297-400, Brasília, DF, Brazil

ABSTRACT: *Jatropha curcas* is an important oilseed plant, with considerable potential in the development of biodiesel. Although *Jatropha* seed cake, the byproduct of oil extraction, is a residue rich in nitrogen, phosphorus, potassium, and carbon, with high protein content suitable for application in animal feed, the presence of toxic phorbol esters limits its application in feed supplements and fertilizers. This review summarizes the current methods available for detoxification of this residue, based upon chemical, physical, biological, or combined processes. The advantages and disadvantages of each process are discussed, and future directions involving genomic and proteomic approaches for advancing our understanding of biodegradation processes involving microorganisms are highlighted.

KEYWORDS: *Jatropha curcas* cake, phorbol ester, detoxification, microorganisms

INTRODUCTION

Nonrenewable fossil fuel energy sources are responsible for the emission of pollutants linked to climate change. With the gradual depletion of petroleum reserves, renewable energy

sources based on plant biomass have become ever more important. Among the emerging renewable energy sources today, biodiesel offers numerous advantages over petroleum diesel, with reduced contribution to global warming, low toxicity, high biodegradability, and positive socio-economic impact.¹ According to Castro et al.,² technological, political, economic, social, and environmental factors are important in determining the potential strength in any alternative global bioenergy source. Appropriate crops should ideally provide valuable byproducts from the biofuel production process, guaranteeing economic viability for local smallholder farming.

In addition, the raw materials employed in bioenergy production should also ideally not simultaneously serve as human staple foods, nor cause negative environmental impact.

Jatropha curcas L., which is commonly known as physic nut or purging nut, is an important oleaginous plant species from the Euphorbiaceae family with considerable potential as an industrial crop as a source of biodiesel. Seeds from this tropical shrub are composed of approximately 60% kernel and 40% shell, with kernel material comprising up to 50% oil.³ Higher yields of grains/oils are typically obtained than in many other oleaginous plant species, and extracted oils offer physicochemical characteristics which are appropriate for biodiesel production. High quality fatty acids (monounsaturated oleic and polyunsaturated linoleic acid) are stable at high temperatures, with appropriate semidrying properties, high burning quality, high cetane numbers, and simple conversion into biodiesel by chemical or biological trans-esterification.^{4–8}

Additional important attributes of the crop include rapid growth, resistance to drought and pests, propagation capacity in different soils, perenniality, and, as an industrial nonfood crop, competition avoidance with food agriculture.^{7–13}

Given that *J. curcas* is a plant that is not water demanding and that allows intercropping with annual crops, especially food crops, such cultivation offers a potential additional income for the producer. Given this panorama, *J. curcas* satisfies the requirement guidelines recommended by Castro et al.² with regard to bioenergy sources and represents a potentially viable crop for sustainable family agriculture, especially in semiarid production regions. For effective uptake, however, several R&D challenges need to be resolved, including the lack of commercial cultivars, the standardization of agricultural practices for the crop, a lack of uniformity in fruit maturation, and the need for establishment of economically viable applications of residual cake following oil extraction.^{4,14–16}

Typically, for production of 1 ton of oil by solvent or mechanical extraction, a total of 2.85 tons of *J. curcas* seeds are required as input, with approximately 70% of this plant material still remaining as a crop residue after the extraction process, constituting *J. curcas* seed cake (JCC).^{10,17} This abundant byproduct of oil extraction is a residue which is also rich in nitrogen, phosphorus, potassium, and carbon and, with a significant protein content (at least 16%), can theoretically supply all the amino acids, with the exception of lysine, required for healthy animal growth.^{18,19}

Received: December 5, 2017

Revised: February 15, 2018

Accepted: February 21, 2018

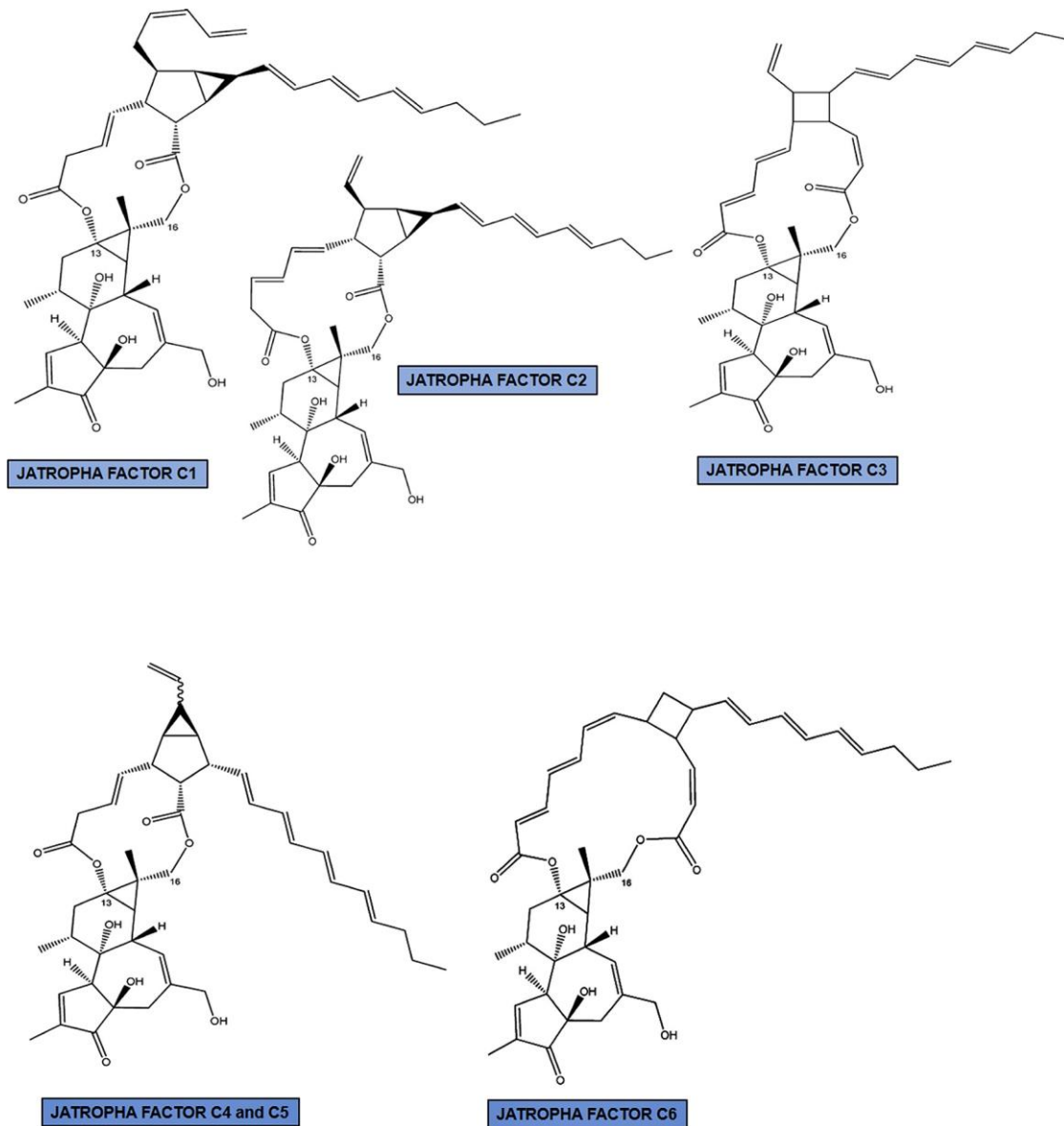


Figure 1. Chemical structures of the phorbol esters C1–C6. Adapted from ref 25.

Despite the significant volume and nutritional characteristics of JCC, the presence of certain bioactive compounds prevents application of this residue in animal feed. Such compounds include antinutritional factors such as trypsin inhibitors and phytates, toxins such as curcins and phorbol esters (PEs), and allergens such as 2S proteins. PEs are the principal toxic components in JCC, which, when ingested, can act either acutely, inducing an intense inflammatory response, or chronically, inducing tumor development. Although these compounds are liposoluble, with most of the PE content of the seed coextracted with the oil, those minimal amounts that remain in the JCC are sufficient to harm several animal species.^{8,20,21}

Efficient detoxification of JCC is therefore a necessary step for subsequent application as fertilizer or as a supplement in animal feed. Numerous detoxification processes for this residue have been described, based on chemical, physical, biological, or combined processes. This review discusses the advantages and disadvantages of each process and highlights future directions involving genomics and proteomics approaches for advancing

our understanding of biodegradation processes involving fungi. The potential in value-added products is presented in relation to both the crop and biodegradation products.

PHORBOL ESTERS

Chemical Structure. PEs are natural substances commonly found in plant species of the families Euforbiaceae and Timelaeaceae.^{8,22} These toxins, which are classified as tetracyclic diterpenes with a tigliane skeleton, are defined as polycyclic compounds in which two hydroxyl groups on neighboring carbon atoms are esterified with fatty acids. The possibilities of ester linkages and the acid fraction, together with the hydroxylation capacity of the parent structure, lead to various PE compounds.^{21,23,24} Tigliane diterpenes are based on a tetracyclic ring system, comprised of A, B, C, and D rings. Each ring possesses a distinct number of members: five members on ring A, seven members on ring B, a six membered C ring, and a cyclopropane system on ring D. The skeleton contains 20 carbon atoms.²¹ To date, six different types of PEs have been characterized in *J. curcas*, all with the same primary

structure as 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. These PEs are referred to as C1–C6 *Jatropha* factors, according to the carbon distribution in their side chains (Figure 1).²⁵

Toxicity. The toxicity for all PEs is typically high even at low concentrations,²¹ with the intensity of acute and chronic effects of these diterpenes dependent upon the PE chemical structure.^{20,22,26} Different forms of PEs can activate distinct cellular pathways in each affected animal species, leading to specific symptoms in animal tissues that range from tumor formation to inflammation, cell differentiation, and apoptosis.²⁴

PEs are amphiphilic molecules with an affinity for phospholipid membrane receptors. During normal cellular signal transduction processes, the enzyme diacylglycerol is the natural activator of protein kinase C (PKC). This enzyme is critical in signal transduction responses to various hormones and in the regulation of cell proliferation. PEs act analogously to diacylglycerol, activating PKC.²¹ Saturable binding between the molecules occurs through specific interactions between the

C1 factor domain and the regulatory region of the PKC molecule.²⁴ Prolonged activation of this host enzyme may lead to myogenic responses, enhancing the efficacy of other carcinogens. PEs are considered as cocarcinogens,²¹ as they do not directly induce the formation of tumors, but promote their growth.²⁷ Acute effects of PEs occur rapidly and intensely, with an inflammatory response of the affected animal a typical first symptom of *Jatropha* intoxication (Figure 2). Here, PEs

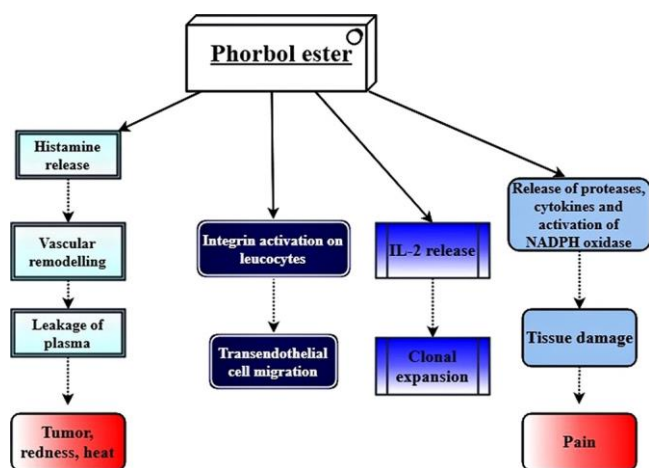


Figure 2. Summary of inflammatory responses induced by phorbol esters. Adapted from ref 21.

will mobilize phospholipids that release arachidonic acid, causing secretion of prostaglandins. In the case of external contact with PEs, inflammation will generally occur in the afflicted area and in the eyes, while, in the case of ingestion, inflammation will mainly occur in the stomach.^{19,20,26,28}

Concentration. The concentration of PEs in JCC will depend upon the oil residue associated with the solid material following seed processing.²⁹ According to Gogoi et al.,³⁰ PEs generally range from 1 to 3 mg/g in JCC and from 3 to 6 mg/g in oil. Levels below 0.09 mg/g in seed cake are considered as tolerable.³¹ The concentration of PEs can vary across production areas, due to cultivation of different regional *J. curcas* genotypes. In Mexico, for example, varieties free of PEs or with only minimal amounts (0.11 mg/g) have been described.^{19,22,32} Here, safe human consumption of seeds, either as peanuts or as pastes, is common in communities in the

Mexican state of Veracruz.^{19,33} Such nontoxic varieties, however, are generally unsuitable for use in biodiesel production, as fruit yields are low and plants are more susceptible to biotic stresses than those containing PEs.¹⁶ Conversely, elevated concentrations can be observed in regional genotypes, with Makkar and Becker,¹⁹ for example, describing elevated concentrations in seed from genotypes grown in Nicaragua, Nigeria, and Cabo Verde, at 2.17, 2.30, and 2.70 mg/g, respectively. In a study comparing PE concentrations in *J. curcas* seed from 18 different regions, Makkar and colleagues²² also observed considerable variation, with PE concentrations ranging from 0.87 to 3.32 mg/g. Similarly, considerable variation in PE content in *J. curcas* seed from different growing regions in China has been reported, with concentrations ranging from 1.098 to 2.417 mg/g. Here, PE derivatives (C1–C6 factors) also varied according to region.³⁴

Biosynthesis. Although understanding of the biosynthesis of PEs is incomplete, a recent study by Li et al.³⁵ provided evidence for the casbane diterpenoid as the precursor of PEs. The casbane synthase genes JcCASA163 and JcCASD168 have been identified in *Jatropha*, with transcriptome analyses reporting expression of JcCASD168 exclusively in seed, while JcCASA163 can be expressed in seeds, leaves, and inflorescences. Following expression in *Escherichia coli*, activity analysis of the JcCASA163 casbane synthase protein was shown to be functional on the substrate geranyl diphosphate (GPP). Function validation of these genes through gene silencing in *J. curcas* supported their involvement in PE biosynthesis, with a significantly decreased PE concentration when compared to control plants. Silencing expression of JcCASA163 was reported to have a greater effect on reducing PE concentration when compared to its homologue JcCASD168, although when both target genes were silenced the reduction in seeds increased, on average up to 80%. As silencing of these two target genes did not result in complete inhibition of PE biosynthesis, these data suggest that other casbane synthases may also be involved in their synthesis, with several homologues of this enzyme present in the *J. curcas* genome.³⁶ Costa et al.³⁷ analyzed the differential expression of genes involved in seed development and germination in *J. curcas* and identified additional genes potentially involved in PE biosynthesis. These included those coding for enzymes involved in terpene synthesis, such as farnesyl-diphosphate synthase (FPS2) and geranylgeranyl diphosphate synthase (GGR).

Biosynthesis of PEs has been reported to take place within the tegmen, the seed inner layer tissue.^{32,38} During the final stages of seed development, the tegmen is crushed and the hydrophobic PEs are believed to diffuse into the endosperm.³⁸ Recent analysis of the *J. curcas* proteome has indicated, however, that PE synthesis may not be occurring in seeds but in other tissues such as leaves or roots, from which they are likely translocated to the developing seed.^{39–41}

Chemical and Physical Degradation. Numerous chemical and physical methods have been described for degradation of PEs, with degradation data for methods summarized in Table 1. PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) is a synthetic phorbol with a very similar structure to natural PEs. This compound can be efficiently degraded within 10 min using ozone in an aqueous solution. Such rapid degradation occurs through oxidation of carbon–carbon double bonds, with the conversion of the ester into a nontoxic compound. This proces

Table 1. Comparison of Physical, Chemical, and Biological Methods for Degradation of Phorbol Esters

Treatment	Degradation method	Initial PE ^a level	Final PE level	Time period	% Reduction	Reference
Physical	ozone	12 ppm	PE decreased to nondetectable level	10 min	100	42
	γ radiation (125 kGy)	0.29 mg/g	0.012 mg/g	not specified	96	30
	sunlight, room temperature	2.09 g/L	1.04 g/L	30 days	49	44
	sunlight, room temperature	2.3 mg/L	PE decreased to nondetectable level	9 days	100	47
Chemical	Hydrogen peroxide oxidation was established and optimized	0.52 mg/g	PE decreased to nondetectable level	8 h	100	43
	methanol solvent extraction	3.6 mg/g	0.10 mg/g	8 h	97.30	48
	ethanol solvent extraction	3.07 mg/g	PE decreased to nondetectable level	60 min	100	49
	surfactants	1.45 mg/g	0.27 mg/g	15 min	80	50
	alkaline (NaHCO ₃)	1.29 mg/g	0.70 mg/g	not specified	55	52
	alkaline and heat	1.78 mg/g	0.13 mg/g	not specified	92	31
	Combined	alkaline and heat (Ca(OH) ₂ and NaOH)	135 mg/g	16 mg/g and 13.6 mg/g	2 h	89
alkaline and heat (NaOH and Ca(OH) ₂)		2.14 g/kg	0.32 g/kg and 0.36 g/kg	not specified	85 and 83.2	51
<i>Bjerkandera adusta</i> and <i>Phlebia rufa</i>		0.82 mg/g	0.05 mg/g and 0.02 mg/g	30 days	91 and 97	53
<i>Pleurotus ostreatus</i>		0.63 mg/g	0.0063 mg/g	60 days	99	54
Biological	<i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Trametes zonata</i>	1.072 mg/g	PE decreased to nondetectable level	20 days	100	62
	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i>	1.072 mg/g	0.28 mg/g and 0.37 mg/g	20 days	73 and 65	62
	<i>Pleurotus sapidus</i> , <i>Pleurotus florida</i> and <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1.072 mg/g	0.27 mg/g, 0.38 mg/g, and 0.6 mg/g	20 days	74, 64, and 45	62
	<i>Trametes hirsute</i> , <i>Trametes versicolor</i> and <i>Trametes gibbosa</i>	1.072 mg/g	0.2 mg/g, 0.15 mg/g, and 0.08 mg/g	20 days	81, 86, and 92	62
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	0.13 mg/g	0.03 mg/g and 0.11 mg/g	7 days	76 and 15	63
	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , and <i>Trichoderma longibrachitum</i>	0.13 mg/g	0.12 mg/g, 0.10 mg/g, and 0.11 mg/g	7 days	7, 23, and 15	63
	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.832 mg/g	0.158 mg/g	6 days	81	64
	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Paecilomyces sinensis</i> , and <i>Cladosporium cladosporioides</i>	2.78 mg/g	0.05 mg/g, 0.03 mg/g, and 0.08 mg/g	30 days	99.7, 98.9, and 96.9	65
	<i>Morganella morganii</i>	not specified	not specified	4 days	92	66
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	not specified	PE decreased to nondetectable level	9 days	100	67
	<i>Bacillus</i> sp.	0.60 mg/g	PE decreased to nondetectable level	7 days	100	68
	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.1199 mg/g	0.04 mg/g	5 days	62	69
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	not specified	PE decreased to nondetectable level	5 weeks	100	45
	<i>J. curcas lipases</i>	1.05 mg/g	0.06 mg/g	12 h	94	71
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.5 mg/g	0.005 mg/g	45 days	99	72

^aPE, phorbol ester.

has been applied with similar efficiency for the degradation of natural PEs in JCC.⁴²

As PEs are susceptible to oxidation, γ radiation is effective in their degradation.³⁰ Exposure of JCC to γ radiation at different doses was reported to decrease the concentration of PEs by 33.4% at 30 kGy and by 96% at 125 kGy. Here, water was also employed as a sensitizing agent, accelerating and facilitating the degradation of the toxic diterpene in the cake, likely as a result of disassociation of water molecules into ions (H⁺ and OH⁻).³⁰ Oxidation of PEs in JCC using hydrogen peroxide has also been reported, with complete degradation after 8 h of exposure.⁴³

Phasukarratchai et al.⁴⁴ reported that sunlight and fluorescent light can also accelerate degradation of PEs in oil extracted from *J. curcas* in a time-dependent manner. While degradation could also occur in pressed seed material, degradation efficiency was lower than in oil, likely due to reduced light penetration in the solid residues.

High temperature treatment of cake has been shown to be ineffective when applied as a single approach for PE elimination, with heating to 160 °C for 30 min ineffective in reducing PE levels significantly.²²

Nakao et al.⁴⁵ investigated PE stability over time in soil, given that JCC has been widely applied as a soil supplement. Their study revealed that PEs could be completely degraded after 35 days of incubation, attributing degradation either to the action of soil microorganisms and their oxidative enzymes or to sunlight penetration and oxidation. Plants subsequently cultivated in the supplemented soil did not show any accumulation of PEs. Effective degradation of JCC PEs in soil was also demonstrated by Devappa et al.,⁴⁶ with only 9 days of incubation necessary for complete degradation of the toxic compound. Similarly, Yunping et al.⁴⁷ reported exposure to sunlight as a rapid method for degradation and detoxification of

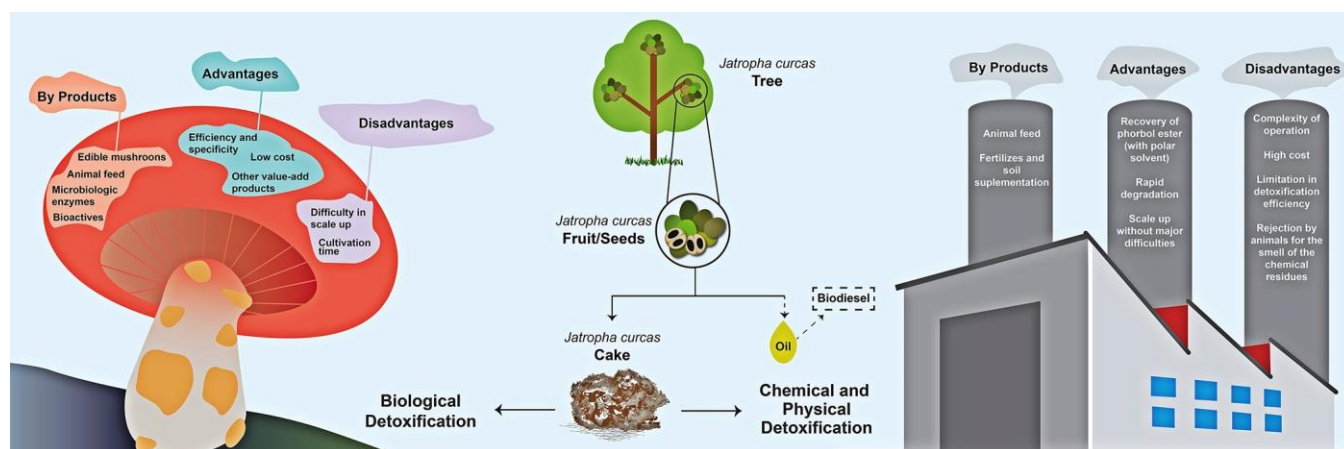


Figure 3. Limitations, advantages, and disadvantages in methods for degradation of phorbol esters in *Jatropha curcas* cake.

PEs present in cake, irrespective of soil type, supporting the safe application of this residue as a fertilizer.

Chemical extraction of PEs, mostly through employment of surfactants and organic solvents, has also been employed for detoxification of JCC. Guedes et al.⁴⁸ reduced by 97.30% the concentration of PEs in cake following an 8 h extraction process. Here, a solute/solvent ratio of 1:10 (w/v) was employed, using Soxhlet and a mixture of methanol (1/2) and ethanol (1/2). Although both solvents were effective in the extraction of PEs, methanol (80–100%) and a short extraction time indicated that PEs have a high affinity for methanol. In another study, by contrast, Nokkaew et al.⁴⁹ were able to extract 100% of PEs in cake using a two-step extraction process with ethanol.

Surfactants can break surface tension between cake material and the toxic hydrophobic compounds, thus releasing PEs from the residue. Two different surfactant solutions have been shown to be effective, one a single nonionic surfactant (Tween group and Dehydol group) and the other a mixed surfactant containing both nonionic and anionic compounds (sodium bis(ethylhexyl) surfactant sulfosuccinate [AOT]).⁵⁰ Here, the Tween group surfactants were more efficient in reducing the diterpene than the Dehydol surfactants, likely as a result of greater compatibility of the polysorbate fraction of this surfactant with the PE structure. The ethoxylate number (EON) of the ethoxylate fatty acid present in the surfactants of the Tween group also appeared to play a greater role in detoxification than the length of the carbon chain tail. Although both surfactant types were able to remove up to 80% of PEs, safe levels could not be reached by this single approach.⁵⁰

Combinations of physical and chemical treatments are also promising approaches for PE degradation.^{29,31} Rakshit and collaborators²⁹ achieved an 89% degradation of PEs present in JCC when combining alkaline conditions (2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and 2% NaOH) and heat treatment (autoclaving at 121 °C for 30 min). Despite the high level of degradation achieved, when treated cake was tested as feed for lab mice, animals showed severe symptoms of exposure to the toxins, with appetite loss, weight loss, diarrhea, reduced motor activity, and death after 12 days. Aregheore et al.³¹ evaluated different concentrations of NaOH and NaOCl followed by heat treatment (autoclaving at 121 °C for 30 min) for PE degradation in JCC. Here, although all treatments were able to reduce PE levels, none were sufficiently effective in reducing concentrations to safe levels. Only a positive control method including quadruple washing

with 92% methanol was able to reach safe levels of toxicity (0.09 mg/g). This study also revealed that heat treatment was ineffective in reduction of PE concentrations. The most efficient combined approach presented in this investigation (4% NaOH (w/v) + 10% NaOCl (w/v)) reduced PE concentration to 0.13 mg/g. Toxicological tests, however, showed that mice fed with JCC after this combined chemical and heat treatment displayed difficulties in feeding, probably as a result of alterations in taste, smell, and texture of the cake. Here, a decreased growth rate, protein efficiency rate, and food processing index were observed when compared to control animals fed on cake detoxified using methanol. In another study with combined approaches, chemical treatment of JCC using NaOH and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ was able to reduce 85% and 83.2% of PEs, respectively, with each compound. After alkaline treatment the cake was also subjected to soaking (overnight) and roasting (100 °C for 30 min). Despite the effective reduction in PEs, sheep fed with a formulation containing JCC as 10% of the diet displayed altered blood metabolite levels and suffered reduced nutrient intake.⁵¹

Elangovan et al.⁵² reported a reduction of 55% of PEs in JCC using chemical treatment with sodium hydroxide and sodium bicarbonate, with a minimum concentration of 3% of each compound necessary for effective reduction of PE. As in similar previous studies, however, cake treated with 3% sodium bicarbonate, when incorporated into sheep feed, subsequently resulted in symptoms of toxicity, including dizziness, poor appetite, diarrhea, and death. Pathological alterations comprised hydropericardium syndrome, heart enlargement, and kidney congestion. Sheep that died within 6 days of feeding showed normal liver pathologies, whereas sheep that died after 10 days of feeding displayed darkened and congested livers.

In conclusion, although numerous chemical and physical treatments have been described for degradation of PEs in *J. curcas*, the majority of treatments are aggressive, causing degradation of proteins and functional amino acids and thus decreasing the nutritional qualities of JCC. Treatments with organic solvents and NaOH can also modify the odor of the crop residue, leading to decreased consumption by animals. The presence of residual toxic solvents such as methanol will also render treated JCC as unfit as a protein source,^{31,51} restricting application of JCC to only fertilizers and soil supplementation. Although chemical treatments can degrade PEs rapidly, requiring considerably less time than biological processes, numerous factors such as operational complexity,

specialized equipment demands, adequate disposal of solvent residues, and limitations in detoxification efficiency⁴³ all limit the consolidation of such methods for PE degradation in JCC.

Biodegradation. The application of biodegrading microorganisms able to degrade toxic terpene metabolites represents a promising strategy for elimination of PEs^{53,54} (Table 1). Terpenes are secondary plant metabolites, many of which play key roles in development and growth, ecological interactions, and defense against pathogens and pests.^{55,56} While such compounds are widely employed in industrial production of edible products, pharmaceuticals, medicinal products, and insecticides,^{55,57,58} the bioprospection of microorganisms capable of degrading such substances is important in bioremediation, since these compounds are the main pollutants in the cellulose and terpene-based industries. Such biodegradation offers a number of advantages to other methods, such as (i) potential greater efficiency, (ii) lower cost, and (iii) production of additional value-added products, such as edible mushrooms or enzymes of biotechnological interest, including laccases, phytases, xylanases, and proteases. Disadvantages with such approaches exist, however, with the kinetics of fermentation considerably slower when compared to chemical and physical methods, and product safety dependent upon microbial secondary metabolism. As numerous fungal species can secrete mycotoxins,⁵⁹ candidate microorganisms must ensure terpene detoxification without simultaneous secretion of toxic secondary metabolites (Figure 3).

Basidiomycete fungi are widely employed in bioconversion processes, such as in the conversion of polymers in lignocellulosic biomass into fermentable sugars, or in the bioremediation of heavy metals and xenobiotic compounds.⁶⁰ Numerous macrofungi have also been used to supplement animal feed, improving the nutritional quality and digestibility of agricultural residues through protein enrichment, lignin degradation, and hemicellulosic fractioning. The cultivation of such fungi on abundant agroindustrial residues thus represents a potentially profitable and economically viable setup.⁶¹ In this context, a number of groups have screened basidiomycete White Rot Fungi (WRF) for its ability to degrade PEs in JCC. Barros et al.⁵³ reported, for example, 91% and 97% reductions in PE concentrations in JCC following 30 days of incubation with *Bjerkandera adusta* and *Phlebia rufa*, respectively. Similarly, Da Luz et al.⁵⁴ observed a 99% reduction in JCC PE levels after 60 days of cultivation with the fungus *Pleurotus ostreatus*. Here, protein content and *in vitro* digestibility of the residue also increased, with decreased final lignin and cellulose content. Edible mushroom production using this substrate was enhanced through alteration of the carbon to nitrogen ratio, mixing additional agroindustrial residues of eucalyptus and coffee bark, as well as rice straw to JCC. Only minimal concentrations of PEs were detected in mushrooms from JCC (0.009 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), representing a concentration 1000-fold lower than that typically detected in nontoxic varieties of *J. curcas*.⁵⁴ Bose and Keharia⁶² also reported effective degradation of PEs in JCC after colonization for 20 days with *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete chysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus florida*, *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsute*, *Trametes versicolor*, and *Trametes zonata*, with the former and latter species enabling complete degradation of PEs in colonized cake.

Belewu and Sam⁶³ also analyzed the potential of the Ascomycete fungi *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus nigricans*, and *Trichoderma*

longibrachitum in PE degradation. Under solid state fermentation for 7 days, *A. niger* was identified as the most efficient species for detoxification of PE, reducing concentrations to safe levels (<0.009 mg/g). Veerabhadrapa et al.⁶⁴ also observed significant degradation of PE with *Aspergillus versicolor*, reporting an 81.1% reduction in PE levels following solid-state fermentation. Optimized conditions of cultivation can also induce efficient secretion of proteases and lipases, enzymes of importance for many industrial applications. Strains of *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces sinensis*, and *Cladosporium cladosporioides* also show potential in PE degradation, with 30 days of cultivation on JCC resulting in 99.7%, 98.9%, and 96.9% reductions in PE content, respectively.⁶⁵

In addition to fungi, certain bacterial species also show promise in PE detoxification. Under optimized conditions of solid-state culture, for example, a strain of the Gram-negative bacterium *Morganella morganii*, isolated from *J. curcas* seed kernel material, resulted in a 92.78% reduction in JCC PEs after 4 days incubation.⁶⁶ Similarly, *Pseudomonas aeruginosa* has also been effectively employed in degradation of PEs, with complete degradation in residual solid biomass observed after 9 days. Numerous lipases were secreted by this bacterial species during cultivation, which are likely to be involved in the degradation process.⁶⁷ Certain spore-forming Gram-positive *Bacillus* species are also able to degrade JCC PEs. In submerged cultivation with JCC, five strains of *Bacillus* sp. were shown to degrade PEs.⁶⁸ After 3 days of cultivation, the percentage of degradation varied from 76.5% to 92.0%, while a seven day cultivation period enabled complete degradation of PEs. Solid culture increased the velocity of PE degradation, with a three day period resulting in degradation of between 86% and 93% of PEs, depending on the tested strain. Under both culture conditions, these bacteria also secreted enzymes of industrial interest, including amylase, cellulase, lipase, pectinase, protease, and xylanase.⁶⁸

Phengnuam and Suntornsuk⁶⁹ also investigated the potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in PE degradation in JCC. In contrast to the previous study,⁶⁸ submerged fermentation resulted in greater bacterial growth, although PE degradation was inferior, with *B. licheniformis* degrading only 60% and *B. subtilis* degrading only 40% of PEs after 5 days of incubation. The authors also reported that degradation of PEs was related not only to bacterial growth but also to esterase activities, through the ability of these enzymes to hydrolyze short chain esters. Esterase activities appeared in both bacterial cultures by the second day of cultivation, peaking after 5 days, with activities of up to 300 U/mL.

Continuing investigations into the role of esterases in PE degradation, Nakao et al.⁴⁵ characterized the esterase KM109 from the Gram-negative *Acinetobacter calcoaceticus*, demonstrating its ability to degrade 13,16-diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol, 12-deoxy-16-hydroxyphorbol-4'-[12',14'-butadienyl]-6'-[16',18',20'-nonatrienyl]-bicyclo[3.1.0] hexane-(13-O)-2'-[carboxylate]-(16-O)-3'-[8'-butenoic-10']ate (DHPB), which is the most abundant PE in *Jatropha* seed and in JCC. In addition to esterases, lipases are also recognized as important enzymes involved in PE degradation, due to their ability to hydrolyze ester bonds, converting PEs to a phorbol moiety and fatty acids.^{70,53} In addition to microbial-derived lipases, plant lipases have also been shown to degrade PEs in JCC, with lipases extracted from germinated seeds of *J. curcas* reducing PEs to nontoxic levels (0.06 mg/g) after 12 h.⁷¹

Additional microbial enzymes likely involved in the degradation of PEs include proteases that hydrolyze diterpene and its derivatives. Such enzymes are highly secreted in *P. aeruginosa* during PE degradation.⁶⁷ Kassuya et al.⁷² raised the hypothesis that the degradation of PEs by basidiomycete fungi may involve enzymes also responsible for lignin depolymerization, with a 45 day incubation period of *Pleurotus ostreatus* on JCC resulting in PE degradation, with concomitant laccase and manganese peroxidase activities.

MOLECULAR STRATEGIES FOR TOXIN DEGRADATION

Although biodegradation of PEs can be achieved through microbial cultivation and enzyme secretion, a complete characterization of the genes, enzymes, and metabolic pathways responsible for degradation of PEs may solve bottlenecks in biodegradation, increasing degradation efficiency through the development of modified microbial strains harboring genes and promoters for increased enzyme secretion. While microbial esterases, lipases, and oxidative enzymes are known to participate in the direct degradation of such plant terpenes, additional enzyme groups are likely involved in the complete degradation of these toxic compounds across prokaryotic and eukaryotic biotransformers.

Although the molecular mechanisms responsible for biodegradation of PEs remain largely unresolved, genes and enzymes involved in the degradation of related plant terpenes have been identified, which are likely also involved in PE degradation. For example, genes and enzymes involved in the degradation of the diterpene abietane have been characterized in *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9.^{73–75} This bacterium is able to degrade nonaromatic abietans and dehydroabietic acid into 7-oxodehydroabietic acid via the dioxygenogenic pathway. Here, the *dit* gene cluster encodes ferredoxin and α - and β -subunits of a class of ring-hydroxylating dioxygenases as well as an extradiol ring-cleavage dioxygenase.⁷³ According to Morgan et al.,⁷⁴ *tdt* genes are also required for the degradation of tricyclic diterpenes in *Pseudomonas diterpeniphila* A19-6a. Knockout of the *tdtL* gene encoding a putative CoA resulted in loss of degradation capacity for dehydroabietic acid diterpenes and abietic acid. Similarly, knockout of the *tdtD* gene (homologous to the *ditQ* gene in *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9), which encodes a cytochrome P450 monooxygenase, limited growth and the ability to degrade tricyclic diterpenes.

Different *Pseudomonas* strains have also been screened for growth on a selective medium with the diterpene dehydroabietic acid (DhA) as sole carbon source. Here, the homologue of the gene *DitA1* (catalytic α -subunit of the diterpenoid dioxygenase) was identified in all strains able to grow on this medium, with the gene either constitutively expressed or expressed in response to DhA, indicating likely involvement in DhA-degradation.⁷⁶

Conifer tree species are known to produce monoterpenes and diterpenes as plant defense mechanisms to pathogens and pests. Certain bark beetles, however, such as the mountain pine beetle *Dendroctonus ponderosae*, can overcome such host defenses and cause severe damage to colonized trees. Through a DGGE and metagenomic approach, Adams et al.⁷⁷ revealed that symbiotic bacterial communities were likely responsible for host terpene degradation, contributing to the beetle's ability to overcome tree defenses. The main genera of bacteria identified in this association were *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Serratia*, and

Burkholderia, with metagenomic data indicating enrichment of genes in these microbial communities involved in limonene and pinene degradation, together with the genes from the diterpene degradation gene cluster *dit*.

Using molecular techniques such as transposon insertion mutation, RT-PCR, and mass spectrometry, Diaz-Pérez et al.⁷⁸ identified the participation of the *gnyRDBHAL* cluster in the degradation of the acyclic terpene citronellol by *Pseudomonas aeruginosa*, with Western blot data indicating *gnyB* and *gnyA* genes encoding geranyl-CoA carboxylase. Forster-Fromme and Jendrossek⁷⁹ similarly reported that *Pseudomonas citronellolis* is also capable of catabolizing acyclic terpenes citronellol and geraniol, again with geranyl-CoA carboxylase as the key enzyme for degradation of these acyclic terpenes. A cluster of eight genes (*atuABCDEFGH*) was identified in the genome of this microorganism encoding proteins with high similarity to the *gnyRDBHAL* cluster in *P. aeruginosa*.

In addition to genes and enzymes characterized in relation to terpene degradation, ligninolytic enzymes allow microorganisms to grow on different recalcitrant lignocellulosic substrates.^{80,81} Such enzymes, which are common to White Rot Basidiomycete fungi, also play roles in the degradation of aromatic pollutants and xenobiotic compounds.^{81–84} In addition to the secreted enzymes involved in degradation, such as manganese peroxidases, lignin peroxidases, versatile peroxidases, and laccases, such fungi also possess intracellular systems of versatile metabolites, allowing them to metabolize intracellularly fragments generated following aromatic lignin degradation.^{85,86} As such, enzyme products of numerous genes are involved in the degradation of xenobiotic substances in Basidiomycetes.

Cytochrome P450 genes are present in the genomes of most organisms and encode a superfamily of heme-containing monooxygenases that metabolize a wide variety of xenobiotic compounds such as polyaromatic hydrocarbons (PAHs), alkanes, terpenes, herbicides, and insecticides.^{87–89} In fungi, they also participate in the synthesis of membrane sterols and in lipid carbon metabolism.⁸⁹ In Basidiomycetes, different functions of these versatile monooxygenases may have contributed to metabolic adaptations such as lignin degradation, production of secondary metabolites, and degradation of xenobiotics.⁸⁶ According to Suzuki et al.,⁹⁰ *Phanerochaete carnosae* contains numerous genes encoding P450 monooxygenases, with enzyme products likely related to the ability of this fungus to degrade phenolic extracts and to colonize heartwood from both softwood and hardwood species. Hirose et al.⁸⁵ also reported the action of Cytochrome P450 monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* in the catalytic conversion of aromatic petrochemical products and environmental pollutants carbazole, dibenzofuran, dibenzothio-phene, fluorene, biphenyl, and naphthalene.

Next generation sequencing (NGS) approaches are applicable for identification of comprehensive data sets of genes and pathways involved in toxin degradation. Recent RNA-seq analysis of gene expression in fungi, for example, has been widely applied in the identification of genes related to degradation of lignocellulosic residues^{83,91–99} as well as in the unraveling of mechanisms involved in plant host/pathogen interactions.^{100–103} Such transcriptomic approaches for the characterization of genes and metabolic pathways in microorganisms that are involved in the biodegradation of plant toxins, by contrast, have been limited, with no specific data yet available with regard to PE degradation.



Figure 4. Applications of crop byproducts that offer added value to the planting of *Jatropha curcas*.

The literature, however, does provide a number of examples of gene discovery in relation to biodegradation of similar plant toxins. Young et al.,¹⁰⁴ for example, investigated the expression of genes in the fungus *Punctularia strigosozonata* related to degradation of petroleum compounds. From a total of 14 transcripts up-regulated only when grown on medium containing oil, transcripts encoding putative oxido-reductases were identified as likely responsible for the degradation of the carbon source. Using a similar approach, Ianiri et al.¹⁰⁵ were able to elucidate the mechanism for degradation of the important mycotoxin Patulin by the yeast *Sporobolomyces sp.* The toxin appeared to induce oxidative stress responses in the fungus, with up-regulation of genes involved in redox and transport, likely involved in detoxification and toxin expulsion. In this organism, patulin degradation likely occurs in the vacuole, with involvement of ABC transporters and vacuolar proteins. NGS genomics and transcriptomics approaches also enabled the identification of *Pseudomonas* species as predominant microbial communities in pine tree resin, which is rich in terpenic compounds. Data identified over 40 bacterial genera and numerous genes involved in the degradation of terpene families, including the diterpene-degradation gene cluster and acyclic terpene degradation pathway genes.¹⁰⁶

Proteomics is also a powerful molecular tool with potential for identification of proteins involved in biodegradation processes. Although no direct investigation of PE degradation and characterization of enzymes involved has yet been published, numerous proteomic based studies have been conducted into the elucidation of biodegradation mechanisms for other natural toxins. For example, Zammit et al.¹⁰⁷ characterized the proteome in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*, which is able to grow in the presence of a number of heavy metals. Differentially expressed proteins were detected by differential gel electrophoresis and identified by liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

Detoxification of Au(III) was shown to be due to a CupC chaperone, which binds to the Au(III) complex. Data suggested that the detoxification of Au and Cu occur in a similar manner or with shared metabolic routes. Proteins related to cell membrane protection were also abundantly expressed, suggesting attenuation of oxidative stress damage caused by Au(III).¹⁰⁷ Using iTRAQ marking combined with proteomic analyses (LC-MS/MS), Chen et al.¹⁰⁸ reported a short-chain dehydrogenase (gi|190348612) with a key role in the degradation of the mycotoxin Patulin by the Ascomycete fungus *Candida guilliermondii*. A total of 30 different proteins involved in 10 biological processes were identified, with 9 proteins up-regulated and 21 down-regulated, indicating a complex mechanism involved in degradation of this mycotoxin.

Given that casbane is a precursor of PEs, in addition to strategies based on the employment of microorganisms and their genes for detoxification of PEs, the down-regulation of casbane synthase may also be effectively applied to reduce PE biosynthesis in *J. curcas*. Using an RNAi approach for casbane synthase genes and a seed-specific promoter, engineering plants with low seed PE content has been reported, revealing promise in PE biosynthesis interception strategies as well as those focused on PE degradation.³⁵

INTEGRATED INDUSTRIAL AND AGRICULTURAL APPLICATIONS OF *JATROPHA*

The high viscosity oil from *Jatropha* seed has appropriate physicochemical characteristics not only for biodiesel production after trans-esterification but also for application in the manufacture of candles, soaps, and cosmetics.⁸

In addition to such potential in cultivation, potential application of crop byproducts also offers added value to the crop, as summarized in Figure 4. In addition to serving as an industrial crop, *Jatropha* may also be used effectively in the recovery of degraded soils and as a wind-break to protect crops

and animals, when planted as a hedgerow. Given that the plant has low water requirements, establishment of the crop is also compatible with intercropping, providing greater income for producers.^{4,8,16} In order to encourage greater uptake of *J. curcas* by smallholder farmers and cooperatives, however, a number of obstacles still need to be overcome, such as the lack of commercial cultivars, the definition of standardized agricultural practices, and the need for profitable and safe applications for crop residues. JCC shows considerable potential for recovery nutrient poor soils,¹⁰⁹ increasing organic carbon and soil biological activity. Toxic PEs, although immediately present in JCC, have been shown to degrade in soil environments, as described previously, with no observable negative impact on soil microbial activity.

Although JCC is a residue rich in nitrogen, phosphorus, potassium, and carbon and high in protein content for application as animal feed, with its potential highlighted in the literature,^{72,110,111} the presence of toxic PEs limits its application as a feed supplement or fertilizer. The development of appropriate processing methods for removal of PEs is therefore key to enable JCC to be applied as a nutritive animal feed. As described in this review, biodegradation of PEs has been shown to be effective with numerous Prokaryotic and Eukaryotic microorganisms. Given that Basidiomycete fungi are among the most promising biodegraders,^{53,62,72} their role in PE degradation on JCC also shows potential for exploitation in edible mushroom production and in spent mushroom substrate for animal feed. Ongoing work by our group has revealed numerous edible mushroom species that can degrade 100% of PEs in JCC and with satisfactory biological efficiency and productivity. Toxicological tests have shown evidence that both mushrooms and spent mushroom substrate may be safely used for human consumption and animal supplementation, respectively.

JCC can also serve as a suitable substrate for the production of microbial-derived enzymes with industrial applications. Important examples of producing microorganisms and their enzymes include cellulolytic and xylanolytic enzymes secreted by *Aspergillus niger*,¹¹² lipases and proteases from *P. aeruginosa*, xylanases from *Scytalidium thermophilum*,¹¹³ and amylases, cellulases, lipases, pectinases, proteases, and xylanases from *Bacillus* sp.⁶⁸ JCC has also been shown to be a suitable substrate for Pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. This exopolysaccharide polymer has a number of important applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries.¹¹⁴

Watanabe et al.¹¹⁵ recently described physicochemical conversion methods for *J. curcas* lignocellulosic biomass, where seed coat, kernel, stem, xylem, bark, and leaf tissues were submitted to torrefaction under different temperature conditions. Physicochemical decomposition of cellulose, hemicellulose, and lignin enabled conversion to value-added compounds such as oligosaccharides, glucuronoxylan, and maltodextrin, which can be applied as biorefinery feed stock or fertilizer.

Although this review is focused on detoxification, the recovery of PEs from *Jatropha* leaves with organic solvents also has potential application in the pharmaceutical and agrochemical industries. Antimicrobial, antiparasitic, and antiviral activities have been described,¹¹⁶ with PEs isolated from *J. curcas* oil also employed in prostratin synthesis.²³ Ratnadass and Wink¹¹⁷ also reported applications of PEs as bioinsecticides and molluscicides. According to Devappa and

collaborators,²⁶ methanol-based extraction and recovery is simple and appropriate for scale up, although the storage conditions and period remain limiting factors, given that PEs degrade by auto-oxidation. Cold storage ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) slows down degradation, although loss of biological activity continues to be proportional to storage time.²⁶

FINAL CONSIDERATIONS

The chosen method for detoxification of JCC ultimately depends on the final destination of the crop residue, whether in animal feed, fertilizer, mushroom, and/or enzyme production.

As mentioned, while a number of chemical and physical treatments are able to degrade PEs in *J. curcas*, the majority of such treatments are aggressive, inactivating or decreasing the nutritional qualities of JCC as a result of protein and functional amino acid degradation. Treatments with organic solvents and NaOH, for example, can modify residue odor, leading to decreased consumption by animals. Methanol is also a toxic solvent and may poison the final detoxified cake, making it unfit as a protein source.^{31,51} As a consequence, the use of JCC may become restricted to only fertilizers and soil supplementation.

Factors such as complexity of operation and equipment, adequate disposal of solvent residues, and limitation in detoxification efficiency⁴³ all limit the consolidation of such detoxification methods.

While biodegradation shows potential in terms of efficiency and specificity, this process still presents limitations in terms of cultivation time and scale up. Such treatment with microorganisms, however, not only may enable PE degradation but also may potentially improve the residue nutritional value, through increasing available protein content and reducing lignin fractions, and through contributing bioactives such as β -glucan and ergosterol from fungal mycelium.

Transcriptomic and proteomic approaches offer considerable potential for increasing our understanding of enzymatic degradation of PEs by microorganisms. Elucidation of the genes involved in such processes is an important first step toward the accurate screening of efficient biodegrading species, as well as in the genetic improvement of microbial strains, enabling degradation time and efficiency to be optimized.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: robertmiller@unb.br. Phone: +55-61-3107-3048.

*E-mail: felix.siqueira@embrapa.br. Phone: +55-61-3448-2324.

ORCID

Taisa G. Gomes: [0000-0002-0449-287X](https://orcid.org/0000-0002-0449-287X)

Felix G. De Siqueira: [0000-0001-5239-4994](https://orcid.org/0000-0001-5239-4994)

Robert N. G. Miller: [0000-0002-5798-4552](https://orcid.org/0000-0002-5798-4552)

Funding

This work was financially supported by CAPES (Program 53001010007P8) and CNPq/Embrapa (Project Number 404786/2013-8). RINGM was supported by a fellowship from CNPq (Project Number 307035/2013-1).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Maria Goreti Braga Dos Santos for contributions in figure illustrations.

REFERENCES

- (1) Kiss, A. A.; Dimian, A. C.; Rothenberg, G. Biodiesel by catalytic reactive distillation powered by metal oxides. *Energy Fuels* 2008, 22, 598–604.
- (2) de Castro, A. M. G.; Lima, S. M. V.; Silva, J. F. V. *Complexo agroindustrial de biodiesel no Brasil: competitividade das cadeias produtivas de matérias-primas*; Embrapa Agroenergia: 2010.
- (3) Singh, R.; Vyas, D.; Srivastava, N.; Narra, M. SPRERI experience on holistic approach to utilize all parts of *Jatropha curcas* fruit for energy. *Renewable Energy* 2008, 33, 1868–1873.
- (4) Duraes, F. O. M.; Laviola, B. G. a.; Alves, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. *Plant Sciences Reviews* 2012, 2011, 179.
- (5) Jongschaap, R.; Corre, W.; Bindraban, P.; Brandenburg, W. *Claims and facts on Jatropha curcas L.: global Jatropha curcas evaluation. breeding and propagation programme*; Plant Research International: 2007.
- (6) Koh, M. Y.; Ghazi, T. I. M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2011, 15, 2240–2251.
- (7) Kumar, A.; Sharma, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Ind. Crops Prod.* 2008, 28, 1–10.
- (8) Makkar, H. P.; Becker, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2009, 111, 773–787.
- (9) Abhilash, P.; Srivastava, P.; Jamil, S.; Singh, N. Revisited *Jatropha curcas* as an oil plant of multiple benefits: critical research needs and prospects for the future. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2011, 18, 127–131.
- (10) Achten, W.; Verchot, L.; Franken, Y. J.; Mathijs, E.; Singh, V. P.; Aerts, R.; Muys, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass Bioenergy* 2008, 32, 1063–1084.
- (11) Bailis, R.; McCARTHY, H. Carbon impacts of direct land use change in semiarid woodlands converted to biofuel plantations in India and Brazil. *GCB Bioenergy* 2011, 3, 449–460.
- (12) Becker, K.; Makkar, H. *Jatropha curcas*: a potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technol.* 2008, 20, 104–107.
- (13) Edrisi, S. A.; Dubey, R. K.; Tripathi, V.; Bakshi, M.; Srivastava, P.; Jamil, S.; Singh, H.; Singh, N.; Abhilash, P. *Jatropha curcas* L.: a crucified plant waiting for resurgence. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2015, 41, 855–862.
- (14) Bahadur, B.; Sujatha, M.; Carels, N. *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*; Springer: 2013.
- (15) Carels, N.; Sujatha, M.; Bahadur, B. *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop: Farming. Economics and Biofuel*; Springer Verlag: 2013.
- (16) Laviola, B. G.; Alves, A. A.; Rocha, R. B.; Drumond, M. A., The importance of *Jatropha* for Brazil. *Jatropha, challenges for a new energy crop*; Springer: 2012; pp 71–94.
- (17) Baldini, M.; Ferfuaia, C.; Bortolomeazzi, R.; Verardo, G.; Pascali, J.; Piasentier, E.; Franceschi, L. Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ind. Crops Prod.* 2014, 59, 268–276.
- (18) Belewu, M.; Muhammed, N.; Ajayi, F.; Abdulgafar, D. Performance characteristics of goat fed *Trichoderma* treated feather meal-rice husk mixture. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 2009, 9, 203–208.
- (19) Makkar, H.; Aderibigbe, A.; Becker, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chem.* 1998, 62, 207–215.
- (20) Devappa, R. K.; Makkar, H. P.; Becker, K. *Jatropha toxicity*—a review. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 2010, 13, 476–507.
- (21) Goel, G.; Makkar, H. P.; Francis, G.; Becker, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int. J. Toxicol.* 2007, 26, 279–288.
- (22) Makkar, H.; Becker, K.; Sporer, F.; Wink, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3152–3157.
- (23) Devappa, R. K.; Malakar, C. C.; Makkar, H. P.; Becker, K. Pharmaceutical potential of phorbol esters from *Jatropha curcas* oil. *Nat. Prod. Res.* 2013, 27, 1459–1462.
- (24) Oskouiean, E.; Abdullah, N.; Ahmad, S. Phorbol esters isolated from *Jatropha* meal induced apoptosis-mediated inhibition in proliferation of Chang and Vero cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 13816–13829.
- (25) Haas, W.; Sterk, H.; Mittelbach, M. Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas*. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1434–1440.
- (26) Devappa, R. K.; Roach, J. S.; Makkar, H. P.; Becker, K. Ocular and dermal toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013, 94, 172–178.
- (27) Li, C.-Y.; Devappa, R. K.; Liu, J.-X.; Lv, J.-M.; Makkar, H.; Becker, K. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 620–625.
- (28) Strair, R. K.; Schaar, D.; Goodell, L.; Aisner, J.; Chin, K.-V.; Eid, J.; Senzon, R.; Cui, X. X.; Han, Z. T.; Knox, B. Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8, 2512–2518.
- (29) Rakshit, K.; Darukeshwara, J.; Raj, K. R.; Narasimhamurthy, K.; Saibaba, P.; Bhagya, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 3621–3625.
- (30) Gogoi, R.; Niyogi, U. K.; Tyagi, A. K. Reduction of phorbol ester content in *Jatropha* cake using high energy gamma radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 2014, 7, 305–309.
- (31) Aregheore, E.; Becker, K.; Makkar, H. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. *South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 2003, 21, 51–56.
- (32) He, W.; King, A. J.; Khan, M. A.; Cuevas, J. A.; Ramiaramana, D.; Graham, I. A. Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. *Plant Physiol. Biochem.* 2011, 49, 1183–1190.
- (33) Makkar, H. P.; Martinez-Herrera, J.; Becker, K. Variations in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol ester in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. *J. Plant Sci.* 2008, 3, 260–265.
- (34) Liu, X.; Li, L.; Li, W.; Lu, D.; Chen, F.; Li, J. Quantitative determination of phorbol ester derivatives in Chinese *Jatropha curcas* seeds by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Ind. Crops Prod.* 2013, 47, 29–32.
- (35) Li, C.; Ng, A.; Xie, L.; Mao, H.; Qiu, C.; Srinivasan, R.; Yin, Z.; Hong, Y. Engineering low phorbol ester *Jatropha curcas* seed by intercepting casbene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 2016, 35, 103–114.
- (36) Sato, S.; Hirakawa, H.; Isobe, S.; Fukai, E.; Watanabe, A.; Kato, M.; Kawashima, K.; Minami, C.; Muraki, A.; Nakazaki, N. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. *DNA research* 2010, 18, 65–76.
- (37) Costa, G. G.; Cardoso, K. C.; Del Bem, L. E.; Lima, A. C.; Cunha, M. A.; de Campos-Leite, L.; Vicentini, R.; Papes, F.; Moreira, R. C.; Yunes, J. A. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. *BMC Genomics* 2010, 11, 462.
- (38) King, A. J.; Montes, L. R.; Clarke, J. G.; Affleck, J.; Li, Y.; Witsenboer, H.; Vossen, E.; Linde, P.; Tripathi, Y.; Tavares, E. Linkage mapping in the oilseed crop *Jatropha curcas* L. reveals a locus controlling the biosynthesis of phorbol esters which cause seed toxicity. *Plant biotechnology journal* 2013, 11, 986–996.
- (39) Nakano, Y.; Ohtani, M.; Polsri, W.; Usami, T.; Sambongi, K.; Demura, T. Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Plant Biotechnol.* 2012, 29, 185–189.
- (40) Shah, M.; Soares, E. L.; Lima, M. L.; Pinheiro, C. B.; Soares, A. A.; Domont, G. B.; Nogueira, F. C.; Campos, F. A. Deep proteome analysis of gerontoplasts from the inner integument of developing seeds of *Jatropha curcas*. *J. Proteomics* 2016, 143, 346–352.
- (41) Soares, E. L.; Shah, M.; Soares, A. A.; Costa, J. H.; Carvalho, P.; Domont, G. B.; Nogueira, F. C.; Campos, F. A. Proteome analysis of

- the inner integument from developing *Jatropha curcas* L. seeds. *J. Proteome Res.* 2014, 13, 3562–3570.
- (42) Kuvshinov, D.; Siswanto, A.; Zimmerman, W. Microbubbles Enhanced Synthetic Phorbol Ester Degradation by Ozonolysis. *International Journal of Chemical, Materials Science and Engineering* 2014, 8, 78–81.
- (43) Zhang, M.; Gong, K.; Jiao, S.; Qin, Y.; Xiang, C.; He, J.; Li, B. Rapid Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake by Hydrogen Peroxide Oxidation and Acute Toxicity Evaluation of Detoxified Product. *Agric. Res.* 2014, 3, 302–307.
- (44) Phasukarratchai, N.; Damrongsiri, S.; Tongcumpou, C. Degradation rates of phorbol esters in *Jatropha curcas* L. oil and pressed seeds under different storage conditions. *J. Sci. Food Agric.* 2017, 97, 1482–1487.
- (45) Nakao, M.; Hasegawa, G.; Yasuhara, T.; Ishihara, Y. Degradation of *Jatropha curcas* phorbol esters derived from *Jatropha* oil cake and their tumor-promoting activity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015, 114, 357–364.
- (46) Devappa, R. K.; Makkar, H. P.; Becker, K. Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. *J. Sci. Food Agric.* 2010, 90, 2090–2097.
- (47) Yunping, B.; Ha, B. T. N.; Eunice, Y.; Chueng, L. L.; Yan, H. Light induced degradation of phorbol esters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012, 84, 268–273.
- (48) Guedes, R. E.; de Almeida Cruz, F.; de Lima, M. C.; Luiza, D.; Castro, R. N.; Mendes, M. F. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: analysis with a central composite rotatable design. *Ind. Crops Prod.* 2014, 52, 537–543.
- (49) Nokkaew, R.; Punsuvon, V. Multistage solvent extraction for high yield oil and phorbol esters removal from Thai toxic *Jatropha curcas* meal. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)* 2013, 12, 299–310.
- (50) Phasukarratchai, N.; Tontayakom, V.; Tongcumpou, C. Reduction of phorbol esters in *Jatropha curcas* L. pressed meal by surfactant solutions extraction. *Biomass Bioenergy* 2012, 45, 48–56.
- (51) Katole, S.; Saha, S. K.; Das, A.; Sastry, V. R. B.; Lade, M. H.; Prakash, B. Nutrient intake, digestibility, and blood metabolites of goats fed diets containing processed *jatropha* meal. *Trop. Anim. Health Prod.* 2013, 45, 1563–1569.
- (52) Elangovan, A.; Gowda, N.; Satyanarayana, M.; Suganthi, R.; Rao, S.; Sridhar, M. *Jatropha* (*Jatropha curcas*) seed cake as a feed ingredient in the rations of sheep. *Animal Nutrition and Feed Technology* 2013, 13, 57–67.
- (53) de Barros, C. R.; Ferreira, L. M.; Nunes, F. M.; Bezerra, R. M.; Dias, A. A.; Guedes, C. V.; Cone, J. W.; Marques, G. S.; Rodrigues, M. A. The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. *Engineering in Life Sciences* 2011, 11, 107–110.
- (54) da Luz, J.; Rodrigues, e. M.; Nunes, M. D.; Paes, S. A.; Torres, D. P.; Kasuya, M. C. M. Bio-detoxification of *Jatropha curcas* seed cake by *Pleurotus ostreatus*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2014, 8, 1148–1156.
- (55) Tholl, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006, 9, 297–304.
- (56) Jia, Q.; Li, G.; Köllner, T. G.; Fu, J.; Chen, X.; Xiong, W.; Crandall-Stotler, B. J.; Bowman, J. L.; Weston, D. J.; Zhang, Y. Microbial-type terpene synthase genes occur widely in nonseed land plants, but not in seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016, 113, 12328–12333.
- (57) Maurya, R.; Ravi, M.; Singh, S.; Yadav, P. P. A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia* 2012, 83, 272–280.
- (58) Zerbe, P.; Chiang, A.; Dullat, H.; O'Neil-Johnson, M.; Starks, C.; Hamberger, B.; Bohlmann, J. Diterpene synthases of the biosynthetic system of medicinally active diterpenoids in *Marrubium vulgare*. *Plant J.* 2014, 79, 914–927.
- (59) Zain, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 2011, 15, 129–144.
- (60) Kulikova, N.; Klein, O.; Stepanova, E.; Koroleva, O. Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: Fundamental and applied aspects. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011, 47, 565–579.
- (61) Owen, E.; Smith, T.; Makkar, H. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries: A synthesis of an FAO e-conference. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2012, 174, 211–226.
- (62) Bose, A.; Keharia, H. Phorbol ester degradation in *Jatropha* seedcake using white rot fungi. *3 Biotech* 2014, 4, 447–450.
- (63) Belewu, M.; Sam, R. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake: proximate composition and antinutritional components. *Journal of yeast and fungal research* 2010, 1, 44–46.
- (64) Veerabhadrapa, M. B.; Shivakumar, S. B.; Devappa, S. Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *J. Biosci. Bioeng.* 2014, 117, 208–214.
- (65) Najjar, A.; Abdullah, N.; Saad, W. Z.; Ahmad, S.; Oskoueian, E.; Gherbawy, Y. Removal of Phorbol Esters Present in *Jatropha curcas* Kernel by Fungal Isolates. *International Journal of Agriculture & Biology* 2014, 16, 871–878.
- (66) Zhang, X.; Yang, Z.; Liang, J.; Tang, L.; Chen, F. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid-state fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assessment for its potential utilizations. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2016, 109, 202–210.
- (67) Joshi, C.; Mathur, P.; Khare, S. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 4815–4819.
- (68) Chang, C.-F.; Weng, J.-H.; Lin, K.-Y.; Liu, L.-Y.; Yang, S.-S. Phorbol esters degradation and enzyme production by bacillus using *jatropha* seed cake as substrate. *Journal ISSN* 2014, 1929, 2732.
- (69) Phengnuam, T.; Suntornsuk, W. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 2013, 115, 168–172.
- (70) Najjar, A.; Abdullah, N.; Saad, W. Z.; Ahmad, S.; Oskoueian, E.; Abas, F.; Gherbawy, Y. Detoxification of toxic phorbol esters from Malaysian *Jatropha curcas* Linn. kernel by *Trichoderma* spp. and endophytic fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 2274–2288.
- (71) Hidayat, C.; Hastuti, P.; Utazmi, S.; Wardhani, A. K.; Pradipta, D. S. Enhancing indigenous lipase activity of germinated *Jatropha curcas* L. Seeds for the enzymatic degradation of phorbol ester. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2014, 3, 71–76.
- (72) Kasuya, M. C. M.; da Luz, J. M. R.; da Silva Pereira, L. P.; da Silva, J. S.; Montavani, H. C.; Rodrigues, M. T., Bio-detoxification of *jatropha* seed cake and its use in animal feed. In *Biodiesel-Feedstocks, Production and Applications*; Intech: 2012.
- (73) Martin, V. J.; Mohn, W. W. Genetic Investigation of the Catabolic Pathway for Degradation of Abietane Diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *Journal of bacteriology* 2000, 182, 3784–3793.
- (74) Morgan, C.; Wyndham, R. Characterization of tdt genes for the degradation of tricyclic diterpenes by *Pseudomonas diterpeniphila* A19-6a. *Can. J. Microbiol.* 2002, 48, 49–59.
- (75) Smith, D. J.; Martin, V. J.; Mohn, W. W. A cytochrome P450 involved in the metabolism of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *Journal of bacteriology* 2004, 186, 3631–3639.
- (76) Witzig, R.; Aly, H. A.; Strömpl, C.; Wray, V.; Junca, H.; Pieper, D. H. Molecular detection and diversity of novel diterpenoid dioxygenase Dita1 genes from proteobacterial strains and soil samples. *Environ. Microbiol.* 2007, 9, 1202–1218.
- (77) Adams, A. S.; Aylward, F. O.; Adams, S. M.; Erbilgin, N.; Aukema, B. H.; Currie, C. R.; Suen, G.; Raffa, K. F. Mountain pine beetles colonizing historical and naive host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79, 3468–3475.
- (78) Diaz-Perez, A.; Zavala-Hernandez, A.; Cervantes, C.; Campos-Garcia, J. The gnyRDBHAL cluster is involved in acyclic isoprenoid

degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 2004, 70, 5102–5110.

(79) Förster-Fromme, K.; Jendrossek, D. Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 264, 220–225.

(80) Bonugli-Santos, R. C.; Durrant, L. R.; Sette, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. *Water, Air, Soil Pollut.* 2012, 223, 2333–2345.

(81) Feofilova, E.; Mysyakina, I. Lignin: Chemical structure, biodegradation, and practical application (a review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016, 52, 573–581.

(82) Arun, A.; Eyini, M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 8063–8070.

(83) Chen, L.; Gong, Y.; Cai, Y.; Liu, W.; Zhou, Y.; Xiao, Y.; Xu, Z.; Liu, Y.; Lei, X.; Wang, G. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. *PLoS One* 2016, 11, e0160336.

(84) Mori, T.; Kondo, R. Oxidation of chlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran by white-rot fungus, *Phlebia lindtneri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 216 (2), 223–227.

(85) Hirose, S.; Tazaki, M.; Hiratsuka, N.; Yanai, S.; Kabumoto, H.; Shinkyo, R.; Arisawa, A.; Sakaki, T.; Tsunekawa, H.; Johdo, O. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, 407, 118–123.

(86) Ichinose, H. Cytochrome P450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2013, 60, 71–81.

(87) Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 2006, 124, 128–145.

(88) Girvan, H. M.; Munro, A. W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016, 31, 136–145.

(89) Hsu, K.-H.; Lee, Y.-R.; Lin, Y.-L.; Chu, F.-H. Cytochrome P450 Genes in Medicinal Mushroom *Antrrodia cinnamomea* TT Chang et WN Chou (Higher Basidiomycetes) are Strongly Expressed During Fruiting Body Formation. *Int. J. Med. Mushrooms* 2011, 13, 513–523.

(90) Suzuki, H.; MacDonald, J.; Syed, K.; Salamov, A.; Hori, C.; Aerts, A.; Henrissat, B.; Wiebenga, A.; Barry, K.; Lindquist, E. Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosa* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. *BMC Genomics* 2012, 13, 444.

(91) Alfaro, M.; Castanera, R.; Lavín, J. L.; Grigoriev, I. V.; Oguiza, J. A.; Ramírez, L.; Pisabarro, A. G. Comparative and transcriptional analysis of the predicted secretome in the lignocellulose-degrading basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Microbiol.* 2016, 18, 4710–4726.

(92) Borin, G. P.; Sanchez, C. C.; Santana, E. S.; Zanini, G. K.; Santos, R. A. C.; Pontes, A. O.; Souza, A. T.; Dal, R. M. M. T. S.; Riaño-Pachón D. M.; Goldman, G. H. Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics* 2017, 18, 501.

(93) Bozan, M.; Akyol, Ç.; Ince, O.; Aydin, S.; Ince, B. Application of next-generation sequencing methods for microbial monitoring of anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101, 6849–6864.

(94) Hori, C.; Ishida, T.; Igarashi, K.; Samejima, M.; Suzuki, H.; Master, E.; Ferreira, P.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Held, B.; Canessa, P. Analysis of the *Phlebiopsis gigantea* genome, transcriptome and secretome provides insight into its pioneer colonization strategies of wood. *PLoS Genet.* 2014, 10, e1004759.

(95) Martinez, D.; Berka, R. M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S. E.; Chapman, J.; Chertkov, O.; Coutinho, P. M.; Cullen, D. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus

Trichoderma reesei (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* 2008, 26, 553–560.

(96) Miao, Y.; Liu, D.; Li, G.; Li, P.; Xu, Y.; Shen, Q.; Zhang, R. Genome-wide transcriptomic analysis of a superior biomass-degrading strain of *A. fumigatus* revealed active lignocellulose-degrading genes. *BMC Genomics* 2015, 16, 459.

(97) Navarro, D.; Rosso, M.-N.; Haon, M.; Olive, C.; Bonnin, E.; Lesage-Meessen, L.; Chevret, D.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B.; Berrin, J.-G. Fast solubilization of recalcitrant cellulosic biomass by the basidiomycete fungus *Laetisaria arvalis* involves successive secretion of oxidative and hydrolytic enzymes. *Biotechnol. Biofuels* 2014, 7, 143.

(98) Sablok, G.; Fu, Y.; Bobbio, V.; Laura, M.; Rotino, G. L.; Bagnaresi, P.; Allavena, A.; Velikova, V.; Viola, R.; Loreto, F. Fuelling genetic and metabolic exploration of C3 bioenergy crops through the first reference transcriptome of *Arundo donax* L. *Plant biotechnology journal* 2014, 12, 554–567.

(99) Zhang, L.; Wang, Z.-X.; Wang, Y.; Huang, B. Transcriptomic Profile of Lignocellulose Degradation from *Trametes versicolor* on Poplar Wood. *BioResources* 2017, 12, 2507–2527.

(100) Massart, S.; Perazzolli, M.; Höfte, M.; Pertot, I.; Jijakli, M. H. Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. *BioControl* 2015, 60, 725–746.

(101) Molitor, A.; Zajic, D.; Voll, L. M.; Pons-Kühnemann, J.; Samans, B.; Kogel, K.-H.; Waller, F. Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2011, 24, 1427–1439.

(102) Passos, M. A.; de Cruz, V. O.; Emediato, F. L.; de Teixeira, C. C.; Azevedo, V. C. R.; Brasileiro, A. C.; Amorim, E. P.; Ferreira, C. F.; Martins, N. F.; Togawa, R. C. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. *BMC Genomics* 2013, 14, 78.

(103) Soanes, D. M.; Chakrabarti, A.; Paszkiewicz, K. H.; Dawe, A. L.; Talbot, N. J. Genome-wide transcriptional profiling of appressorium development by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* 2012, 8, e1002514.

(104) Young, D.; Rice, J.; Martin, R.; Lindquist, E.; Lipzen, A.; Grigoriev, I.; Hibbett, D. Degradation of bunker C fuel oil by white-rot fungi in sawdust cultures suggests potential applications in bioremediation. *PLoS One* 2015, 10, e0130381.

(105) Ianiri, G.; Idnurm, A.; Castoria, R. Transcriptomic responses of the basidiomycete yeast *Sporobolomyces* sp. to the mycotoxin patulin. *BMC Genomics* 2016, 17, 210.

(106) Vilanova, C.; Marín, M.; Baixeras, J.; Latorre, A.; Porcar, M. Selecting microbial strains from pine tree resin: biotechnological applications from a terpene world. *PLoS One* 2014, 9, e100740.

(107) Zammit, C. M.; Weiland, F.; Brugger, J.; Wade, B.; Winderbaum, L. J.; Nies, D. H.; Southam, G.; Hoffmann, P.; Reith, F. Proteomic responses to gold (III)-toxicity in the bacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Metallomics* 2016, 8, 1204–1216.

(108) Chen, Y.; Peng, H.-M.; Wang, X.; Li, B.-Q.; Long, M.-Y.; Tian, S.-P. Biodegradation Mechanisms of Patulin in *Candida guilliermondii*: An iTRAQ-Based Proteomic Analysis. *Toxins* 2017, 9, 48.

(109) Anand, K. V.; Kubavat, D.; Trivedi, K.; Agarwal, P. K.; Wheeler, C.; Ghosh, A. Long-term application of *Jatropha* press cake promotes seed yield by enhanced soil organic carbon accumulation, microbial biomass and enzymatic activities in soils of semi-arid tropical wastelands. *Eur. J. Soil Biol.* 2015, 69, 57–65.

(110) Kumar, S.; Kaushik, N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PLoS One* 2013, 8, e56202.

(111) Makkar, H. P. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016, 222, 87–99.

(112) Ncube, T.; Howard, R. L.; Abotsi, E. K.; van Rensburg, E. L. J.; Ncube, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of

xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.* 2012, 37, 118–123.

(113) Joshi, C.; Khare, S. Utilization of deoiled *Jatropha curcas* seed cake for production of xylanase from thermophilic *Scytalidium thermophilum*. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 1722–1726.

(114) Choudhury, A. R.; Prasad, G.; Sharma, N. Deoiled *Jatropha* seed cake is a useful nutrient for pullulan production. *Microb. Cell Fact.* 2012, 11, 39.

(115) Watanabe, T.; Shino, A.; Akashi, K.; Kikuchi, J. Chemical profiling of *Jatropha* tissues under different torrefaction conditions: application to biomass waste recovery. *PLoS One* 2014, 9, e106893.

(116) Insanu, M.; Dimaki, C.; Wilkins, R.; Brooker, J.; van der Linde, P.; Kayser, O. Rational use of *Jatropha curcas* L. in food and medicine: from toxicity problems to safe applications. *Phytochem. Rev.* 2013, 12, 107–119.

(117) Ratnadass, A.; Wink, M. The phorbol ester fraction from *Jatropha curcas* seed oil: potential and limits for crop protection against insect pests. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 16157–16171.

Capítulo II: Biodegradação dos
ésteres de forbol da torta de pinhão-
manso pelo basidiomiceto *Pleurotus*
pulmonarius EF88

Resumo

O macrofungo *P. pulmonarius* EF88 é um eficiente biodegradador dos ésteres de forbol presentes na torta do pinhão-manso. No entanto, a degradação biológica dos ésteres de forbol enfrenta alguns gargalos importantes que podem ser resolvidos com métodos de melhoramento genéticos. Análises referentes ao RNA-seq e proteoma foram escolhidas como estratégias para tentar identificar genes e proteínas chave envolvidas nesse processo de biodegradação. Dessa forma, o primeiro passo para realizar análises transcritômicas e proteômicas foi a identificação dos pontos críticos a serem avaliados. A curva de degradação dos EFs por *P. pulmonarius* ao longo de 30 dias de cultivo sólido foi usada como parâmetro para determinar os pontos do transcrito e proteoma. Também foram quantificadas atividades enzimáticas de enzimas que possam estar relacionadas a ação degradadora dos ésteres de forbol e de interesse industrial. A degradação dos EFs ocorreu em todos os momentos analisados. No 21º dia de cultivo, a concentração desse diterpeno foi reduzida para níveis considerados atóxicos (0,06 mg/g), e ao final de 30 dias de cultivos restaram apenas 0,02 mg/g do composto tóxico. O pico de degradação ocorre entre os dias 7 e 11 de cultivo. Não foram detectadas atividades de lipases e esterases. Atividades de enzimas oxidativas (lacases e MnP) e proteases permaneceram altas durante todo o cultivo, principalmente no cultivo em substrato tóxico. O extrato enzimático bruto de *P. pulmonarius* também foi capaz de degradar os EFs da torta de pinhão-manso, após 36h de tratamento, em condições não otimizadas, comprovando que a degradação dos ésteres de forbol é decorrente de ação enzimática. A eficiência de degradação dos ésteres de forbol pelo extrato enzimático bruto de *P. pulmonarius* está relacionada ao substrato usado no cultivo.

Palavras-chave: éster de forbol, torta de pinhão-manso, extrato enzimático, enzimas, proteases, lacases, macro-basidiomiceto.

Abstract

The macro-basidiomycete *P. pulmonarius* EF88 can efficiently degrade the phorbol esters present in jatropha cake. However, the biological degradation of phorbol esters faces some important bottlenecks that can be solved with genetic improvement. RNA-seq and proteome analysis were used to identify key genes and proteins involved in this biodegradation process. Thus, the first step to carry out transcriptional and proteomic analyzes were the identification of the critical points to be evaluated. The PEs degradation curve were evaluated over 30 days of solid culture and used as a parameter to determine the transcriptome and proteome critical points. Enzymatic activities of other enzymes of industrial interest that could be related to phorbol esters degradation were also quantified. The degradation of EFs occurred at all analyzed moments. On day 21 of cultivation, the concentration of the studied diterpene was reduced to non-toxic levels (0.06 mg/g), and at the end of 30 days of cultivation only 0.02 mg/g of the toxic compound remained. The peak of degradation occurs between days 7 and 11 of culture. Lipase and esterase activities were not detected. Oxidative enzyme activities (laccase and MnP) and proteases remained high throughout the culture, especially in toxic substrate culture. The crude enzymatic extract of *P. pulmonarius* was also able to degrade the PEs of jatropha cake after 36h of treatment under non optimized conditions, attesting that the phorbol esters degradation is due to enzymatic action. The degradation efficiency of phorbol esters by the crude enzymatic extract of *P. pulmonarius* is related to the substrate used in the culture.

Keywords: phorbol ester, jatropha curcas cake, extract, enzymes, proteases, laccases, macrobasidiomycete.

1. Introdução

A cadeia produtiva do biodiesel foi iniciada no Brasil a partir do Programa de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), em 2004. Embora tenha evoluído de forma bastante eficiente, superando as metas iniciais e chegando a 5% de biodiesel no diesel de petróleo três anos antes do previsto, o Programa ainda enfrenta a forte dependência do óleo de soja como única fonte de matéria-prima. O óleo de soja é responsável por cerca de 80% do total de biodiesel produzido no Brasil, sendo o restante distribuído entre sebo bovino, óleo de algodão e todas as demais matérias-primas (Mendes e Costa, 2010; Ramos *et al.*, 2017; Silva e Silva *et al.*, 2017). Idealizado com as premissas de inclusão social, a partir da diversificação da base econômica dos agricultores familiares, o Programa ainda tem como desafio encontrar alternativas viáveis de matérias-primas que atendam essa demanda (Castro, 2010).

Entre as matérias-primas com potencial para produção de biodiesel o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) foi uma das apostas iniciais do PNPB. Porém não se concretizou no Brasil, por inúmeros motivos, mas o principal deles foi a questão agrônômica não estabelecida para cultura. Entretanto, pesquisas voltadas para resolver essas questões agrônômicas e visando explorar potenciais bioprodutos continuam sendo desenvolvidas no Brasil, México, Índia, entre outros países (Capdeville & Laviola, 2013).

O pinhão-mansão pertence à família das Euforbiáceas é uma espécie arbustiva perene, de crescimento rápido e vegeta espontaneamente em diversas regiões do Brasil, podendo atingir mais de 5 m de altura (Duraes *et al.*, 2012; Laviola *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017). Essa oleaginosa apresenta potencial de rendimento de grãos/óleo superior às oleaginosas tradicionais, como a soja, bem como, características físico-químicas de óleo favoráveis à produção de biodiesel e outros bioprodutos (Drumond *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2018). Para se obter 1t de óleo de pinhão-mansão, mediante extração mecânica, são necessárias 2,85 t de sementes (Makkar e Becker, 2009). O resíduo gerado após o processamento da semente de pinhão-mansão (torta) representa cerca de 70% do volume total (Achten *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2018). Assim, torna-se fundamental desenvolver formas de utilização destes

produtos a fim de agregar renda à cadeia produtiva desta oleaginosa (Rodrigues e Rondina, 2013).

Por ser rica em minerais (nitrogênio, fósforo e potássio) a torta de pinhão-manso tem sido utilizada como adubo orgânico, além disso, apresenta teor de proteína significativo (no mínimo 16%) com presença de todos os aminoácidos essenciais (exceto lisina) para crescimento e boa saúde dos animais (Makkar *et al.*, 1997; Belewu *et al.*, 2009). Diante disso, a composição desse coproduto o torna um candidato potencial para ser usado na suplementação animal. No entanto, faz-se necessária a inativação de compostos tóxicos e fatores antinutricionais que estão presentes nesta biomassa vegetal.

Os ésteres de forbol são os principais componentes tóxicos presentes nesse resíduo, e quando ingeridos podem agir no organismo de forma aguda (resposta inflamatória intensa) ou crônica (indução de tumor). Por ser lipossolúvel, grande parte dos ésteres de forbol é extraída juntamente com o óleo. No entanto, quantidades mínimas que ficam nas tortas, já são capazes de causar danos a diversas espécies animais (Makkar *et al.*, 1997; Goel *et al.*, 2007; Makkar e Becker, 2009). A semente de pinhão-manso em diversos estudos com animais, ruminantes (bovinos e caprinos) e monogástricos (camundongos, ratos, frangos, peixe, humanos), demonstraram toxicidades, e dependendo da dose podem levar os animais à morte em poucos dias (Mendonça e Laviola, 2009).

No México, precisamente na região Papantla no Estado de Veracruz, há ocorrência de variedades de pinhão-manso naturalmente livres de ésteres de forbol ou em quantidades mínimas, estas variedades são consideradas atóxicas (Makkar *et al.*, 1998; Makkar & becker 1999). Essas sementes atóxicas são inclusive incorporadas a alimentação das pessoas da região (Makkar *et al.*, 2009). No entanto esses genótipos não são usados para produção de biodiesel. De acordo com Laviola *et al.* (2011) essas variedades de pinhão-manso apresentam menor vigor e produtividade de frutos em relação plantas tóxicas, além de serem mais suscetíveis a doenças que não são observadas nas plantas onde o éster de forbol se faz presente.

Os ésteres de forbol nas variedades atóxicas de pinhão-manso estão presentes em níveis não detectáveis ou abaixo de 0.11 mg/g (Makkar *et al.*,

1997). Ratos e peixes não apresentam nenhum sinal de toxidez quando alimentados com torta de pinhão-manso provenientes das variedades atóxicas da região de Papantla (Makkar et al., 1999). Como dito anteriormente, essas sementes são consumidas pelos moradores do estado de Veracruz e nenhum sintoma intoxicação foi exibido. A semente pode ser torrada e consumida como amendoim ou incorporada a alimentação em forma de pasta (Makkar e becker 1998, Makkar et Makkar et al., 2009)

Diversas estratégias químicas e biológicas têm sido abordadas na tentativa de resolver este problema, no entanto algumas destas estratégias são inviáveis economicamente, ou então resolvem parcialmente o problema da toxicidade, o que possibilita apenas a mistura de um percentual muito baixo da torta na ração animal (Gomes *et al.*, 2018). Na linha biológica de destoxificação, os macro-basidiomicetos são eficientes degradadores de ésteres de forbol (De Barros *et al.*, 2011; Luz *et al.*, 2012).

Gomes (2015) realizou um *screening* com 13 cepas de macro-basidiomicetos capazes de crescer em torta de pinhão-manso. Dentre essas cepas, *P. pulmonarius* EF88 foi o fungo mais eficiente na degradação dos ésteres de fobol. Após 60 dias de cultivo destoxificou de forma efetiva o resíduo e ainda foi possível produzir cogumelos comestíveis de forma viável. Ensaio toxicológicos foram feitos para assegurar a destoxificação, e os animais (artêmia salina e ratos) não apresentaram sinais de toxicidade (dados não publicados).

Os macro-basidiomicetos apresentam a capacidade de produzir simultaneamente enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradar substratos lignocelulósicos, e por isso são usados em tratamentos biológicos para degradação de lignina e compostos tóxicos (Sharma & Arora , 2010; Yang et al , 2010; Camassola & Dillon, 2009). Atualmente o grande foco nas pesquisas envolvendo macro-basidiomicetos estão voltadas para as principais enzimas secretas por estes, tais como lacases e manganês peroxidase (MnP). O complexo enzimático secretado por esses fungos dependerá do substrato usado no cultivo, e é justamente essa ampla gama de enzimas que permite que esses fungos sejam utilizados em diversos processos.

Apesar da alta eficiência na degradação dos ésteres de forbol, essa biodegradação apresenta alguns desafios como: tempo de cultivo e dificuldade

de escalonamento. O entendimento das vias metabólicas e enzimas envolvidas nesse processo de destoxificação torna-se primordial para solucionar esses desafios. Técnicas moleculares como sequenciamento do transcrito e análise do proteoma do fungo, em resposta a molécula tóxica, são ferramentas com vasto potencial e podem ser usadas para chegar em genes e proteínas chave no processo de biodestoxificação.

Nesse capítulo foram discutidos e mostrados resultados referentes a curva de degradação dos ésteres de forbol e atividade de vários grupos enzimáticos ao longo de 30 dias de cultivo. Esses dados também serviram como parâmetros para a escolha dos tempos de cultivo para análise do transcrito via RNA-seq e proteoma via LC-MS-MS.

2. Objetivos do capítulo

2.1 Objetivos específicos do capítulo

- Analisar a curva de degradação dos ésteres de forbol pelo fungo *P. pulmonarius* ao longo de 30 dias de cultivo, e assim determinar os tempos de cultivo para análise do transcritoma e secretoma do basidiomiceto em resposta ao cultivo em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica.
- Determinar a influência da torta de pinhão-manso (tóxica e atóxica) nas atividades enzimáticas oxidativas e hidrolíticas de *P. pulmonarius* EF88 com potencial envolvimento na degradação dos ésteres de forbol.
- Determinar a capacidade isolada do extrato enzimático de *P. pulmonarius* frente a degradação dos ésteres de forbol.

3. Metodologia

3.1 Cultivo de *P. pulmonarius* EF-88 em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica

A cepa de *P. pulmonarius* EF88 proveniente da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Biorefinaria (CMMABIO) da Embrapa Agroenergia foi preservada no método *Castellani* (Castella, 1967). Posteriormente, para a obtenção da cepa de trabalho um dos discos em estoque foi transferido para placas com meio de cultivo ágar pinhão-manso, incubados á 28°C por 7 dias. Para o cultivo em estado sólido foram usadas placas de petri de vidro (150mm x 20mm) com 100g de cada substrato (torta tóxica e atóxica) e umidade de 70%. O material foi esterilizado em autoclave á 121°C, 1 atm por 120 minutos. Após o resfriamento das placas, em câmara de fluxo laminar estéril, o micélio do fungo *P. pulmonarius*, previamente repicado (como descrito anteriormente) foi inoculado em torta de pinhão-manso tóxica (bioensaio T) e em torta de pinhão-manso atóxica (bioensaio NT). O cultivo ocorreu em estufa (BOD) com temperatura controlada (28°C). Foram retiradas amostras de 3 em 3 dias para extração dos ésteres de forbol e quantificação das atividades enzimáticas.

3.2 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Para obtenção do extrato enzimático bruto, o substrato sólido foi diluído em água destilada gelada na proporção de 1:2. Dessa forma, 25g de substrato foram ressuspensos em 50 mL de água destilada e adicionados em erlenmeyer de 150 mL. A mistura foi então homogeneizada em shaker (agitação mecânica) durante 40 min a 5°C. O extrato enzimático foi filtrado em funil de buchner com papel de filtro e auxílio de bomba de vácuo. Para evitar contaminações foi adicionado azida sódica junto ao extrato (1mL para 50mL de extrato).

3.3. Determinação dos Açúcares Redutores - DNS

Para a determinação dos açúcares redutores liberados após reações enzimáticas, utilizou-se uma modificação do método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), originalmente proposto por Miller (1959). O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após aquecimento, a solução torna-se avermelhada, sendo lida em espectrofotômetro a 540 nm. O preparo da solução de DNS seguiu o método de Ghose (1987).

3.4. Determinação das atividades de holocelulases

Os ensaios enzimáticos para determinação de CMCase (endoglicanase), xilanase, pectinase e mananase presentes no extrato bruto enzimático foram realizados utilizando 50 μ L de enzima (extrato bruto) e 100 μ L de substrato (Carboximetilcelulose, xilana, pectina cítrica ou galactomanana), sendo os três primeiros ensaios com solução de 1% do substrato e 0,5% para mananase, que reagiram por 30 minutos a 50°C. Após este tempo foram adicionados 300 μ L de DNS (preparado de acordo com 3.3) e os tubos com os ensaios foram fervidos por 10 minutos. Adicionou-se 1,5 mL de água para leitura do ensaio no espectrofotômetro a 540 nm. Para o ensaio de FPase (celulase total) foi utilizado como substrato papel Whatman número 1 em forma de tiras de 1x6 cm, com aproximadamente 50 mg de massa, e 150 μ L de enzimas (extrato bruto), que foram incubadas por 1 h a 50°C. Os ensaios de FPase foram interrompidos e analisados como descrito acima para outras holocelulases.

Para determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas as curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos, seguindo os protocolos descritos no item 3.3. Para calibração foi utilizado uma solução estoque de 2 mg/mL para cada açúcar redutor quantificado pelo método DNS, conforme descrito item 3.3 (glicose, xilose,

manose e ácido galacturônico). Variando a concentração do açúcar redutor com água destilada, assim foram construídos 5 pontos do gráfico de regressão linear, e a partir da equação da reta obtida pelo método DNS. Para todos os ensaios enzimáticos foi utilizado $UI.mL^{-1}$ como unidade de açúcar redutor liberada durante todo o tempo do ensaio enzimático. Unidade internacional (UI) representa a quantidade que a enzima necessita para liberar $1 \mu mol$ de açúcar redutor por minuto.

3.5. Atividades de proteases

O método de determinação das atividades proteolíticas foram realizados de acordo com o protocolo de (Charney e Tomarelli, 1947), com adaptações. Os ensaios para proteases presentes no extrato bruto ocorreram em tubos plásticos de 2 mL. Foram adicionados 500 μL do filtrado (extrato bruto enzimático), 500 μL de azocaseína, incubados em banho-maria a $37^{\circ}C$ por 40 min. Após o termino de incubação (40 min) a reação foi paralisada com TCA (ácido tricloroacético). No preparo do branco da amostra para que não haja reação enzimática o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Para o branco adicionou 500 μL de azocaseína, 500 μL de tampão acetato de sódio pH 5. As amostras foram a 6000 rpm, por 10 min a $4^{\circ}C$. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos, então adicionou-se 1 mL de KOH 0,5 M. A leitura em espectrofotômetro foi a 430 nm. Para o cálculo da atividade de protease não foi usada curva padrão como a metodologia usando DNS, mas sim uma fórmula, descrita abaixo:

$$X = \left(\frac{\frac{Abs}{0,001}}{t(\text{min}) \times V.\text{enzima} \times V.EC} \right) * \text{Volume total ensaio}$$

$$X = \text{valor } U/mL$$

Onde:

- Abs = Absorbância ensaio - Absorbância branco
- t = tempo em minutos no banho-maria;
- V = volume

- EC = ensaio colorimétrico

3.6. Lacases

A atividade de lacases foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A mistura reacional para ABTS continha 0,45 mM do ABTS preparado em tampão acetato de (sódio pH 5,0 90 mM) e 1 mL de amostra diluída 10 vezes com água destilada. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 segundos a 25°C (Wolfenden & Wilson, 1982).

$$\Delta Abs \times 10^6 = \frac{Enzima \left(\frac{U}{L} \right)}{\varepsilon \times V \times T}$$

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ε = Lacase: 36000 L.mol⁻¹cm⁻¹;

V = volume (mL) do sobrenadante

T = Tempo de reação (min).

3.7. Atividade de Lignina peroxidase

A atividade de LiP foi determinada pela oxidação de álcool veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien & Kirk (1984). O meio reacional foi composto de 500 µL de sobrenadante do extrato enzimático centrifugado, 200 µL de álcool veratrílico (2 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 3,0) e 200 µL de peróxido de hidrogênio (2 mM). A formação de aldeído veratrílico foi acompanhada pela leitura da absorbância a 310 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) por 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

$$\Delta Abs \times 10^6 = \frac{Enzima \left(\frac{U}{L} \right)}{\varepsilon \times V \times T}$$

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = LiP: 9300 L.mol⁻¹cm⁻¹;

V = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

3.8. Manganês peroxidases

A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por (Kuwahara *et al.*, 1984). A mistura reacional consistiu de 50 mg.mL⁻¹ de vermelho de fenol, 50 mM de sulfato de manganês, 50 mM de H₂O₂, 12,5 mM de lactato de sódio, 500 mg.mL⁻¹ de albumina bovina e tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL de amostra (extrato bruto enzimático). Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 mL de NaOH- 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610 nm).

$$\Delta Abs \times 10^6 = \frac{Enzima \left(\frac{U}{L} \right)}{\epsilon \times V \times T}$$

Onde:

ΔAbs = valor de absorbância

ϵ = MnP: 460L.mol⁻¹cm⁻¹;

V = volume (mL) do sobrenadante;

T = Tempo de reação (min).

3.9. Atividade esterase e lipase

A determinação da atividade esterase e lipase foi por método titulométrico de acordo com protocolo de Diaz, (2006). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triagliceróis na reação de hidrolise. Para os ensaios enzimáticos foi feita uma emulsão com 2,5 mmol. L⁻¹ de tampão Tris-HCL pH 7,0; 150 mmol. L⁻¹ de NaCl; 2 mmol. L⁻¹ de CaCl₂, com adição de 3% de goma arábica. Para determinação de lipases usou-se como substrato óleo de oliva (66 mmol. L⁻¹)

e tributirina (66 mmol. L⁻¹) para ensaio enzimático de esterases.

3.10 Extração metanólica de éster de forbol e quantificação via HPLC

Após o término de tempo dos cultivos do do *P. pulmonarius* EF88 foram feitas as extrações dos ésteres de forbol. A extração desse composto ocorreu conforme o protocolo estabelecido na Embrapa Agroenergia (Ribeiro et al., 2014).

As amostras foram secas em estufa a 50°C durante 64 h e maceradas em cadinhos de porcelana. Pesou-se 3 g da amostra macerada em tubos falcon de 50 mL e adicionou-se 15 mL de metanol (grau PA) em cada tudo. As amostras junto com o solvente foram agitadas por 1 minuto com bastão de vidro e colocados em banho-ultrasson com gelo durante 3 minutos e centrifugou-se a 9000 rpm á 25°C durante 8 minutos (etapa repetida por duas vezes para obter maior acurácia da extração). Os sobrenadantes foram transferidos para balão de 100 mL de fundo redondo. O metanol foi removido em rota-evaporador a 40°C (a temperatura do banho controlada abaixo de 40°C); após a evaporação completa do solvente, o resíduo foi ressuspendido com 2,5 mL de metanol, o balão foi submetido a banho-ultrasson durante 4 minutos a temperatura ambiente.

O material foi transferido para balão volumétrico de 5 mL (ação repetida mais uma vez). A quantificação dos ésteres extraídos foi feita cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detector por espectrometria de massas (UPLC-MS), com uma coluna C18 de fase reversa HSS T3. A fase móvel foi composta de porção aquosa, com 0,2% de ácido fórmico e porção orgânica, de 70% de acetonitrila e 30% de etanol, com as porções na proporção de 1:1 (v:v).

3.11. Cultivo sólido de *P. pulmonarius* EF-88 em diferentes fontes de carbono e obtenção do extrato bruto enzimático

O fungo EF-88 foi cultivado em três substratos diferentes: torta de pinhão-manso (tóxica), torta de pinhão-manso (atóxica) e meio BDA (batata dextrose ágar). O cultivo ocorreu em placas de petri de vidro (ver tamahho),

com 80g de substrato (torta de pinhão-manso) umedecidos com 80mL de água destilada (75% umidade), e 200mL de meio BDA (tratamento controle). O material foi autoclavado por 20 min, à 121°C e 1 atm de pressão. Inoculou-se 10 discos de 8mm de massa micelial em cada placa, o experimento foi realizado em triplicata. O material foi então incubado à 28°C, por 7 dias. Para obtenção dos extratos brutos (enzimas extracelulares) os conteúdos dos frascos foram transferidos para Erlenmeyers estéreis de 250 mL, que foram acrescidos de água destilada estéril (1:2 m/v) e incubados em shaker à 4°C e 180 rpm, por 40 minutos. O material foi, então, filtrado utilizando gazes de fio de algodão e funis de buchner, em falcons de 50 mL estéreis, que foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 8.000g. O experimento foi conduzido sem adição de azida sódica nos extratos enzimáticos brutos.

3.12 Biodegradação enzimática dos ésteres de forbol

Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 100 mL com 1g de torta de pinhão-manso e adição de 10 mL dos extratos brutos, sem adição de azida sódica. Os ensaios foram conduzidos por 18h e 36h sob agitação 230 rpm à 37°C. Os controles foram feitos utilizando água destilada autoclavada no lugar dos extratos enzimáticos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4. Resultados

4.1. Degradação dos ésteres de forbol pelo basidiomiceto *P. pulmonarius* ao longo de 30 dias de cultivo estado sólido

Os resultados de degradação dos ésteres de forbol, obtidos ao longo de 30 dias de cultivo estado sólido, estão apresentados na figura 6. No 3º dia de cultivo, primeiro ponto avaliado, é possível observar uma redução de 28% dos ésteres de forbol em relação ao controle *in natura* (resíduo sem tratamento biológico). No terceiro ponto quantificado, 9º dia de cultivo, houve uma redução significativa não somente em relação ao controle (70%), como também em relação ao ponto anterior ou 6º dia de tratamento (52%). O mesmo padrão foi observado no ponto posterior (12º dia) onde os ésteres de forbol presentes no substrato foram reduzidos para 0,147 mg/g com taxa de degradação de 90% em relação ao controle e de 68% em relação ao nono dia.

Concentrações de ésteres de forbol inferiores a 0,09 mg/g são consideradas atóxicas ou seguras biologicamente (Aregheore et al. 2003). Após 21 dias de tratamento biológico, os níveis de ésteres de forbol foram reduzidos para 0,06 mg/g (linha vermelha – figura 6), níveis seguros de toxicidade. No final de 30 dias de cultivo restaram apenas 0,02 mg/g do composto tóxico, uma degradação de 98% em relação ao substrato inicial.

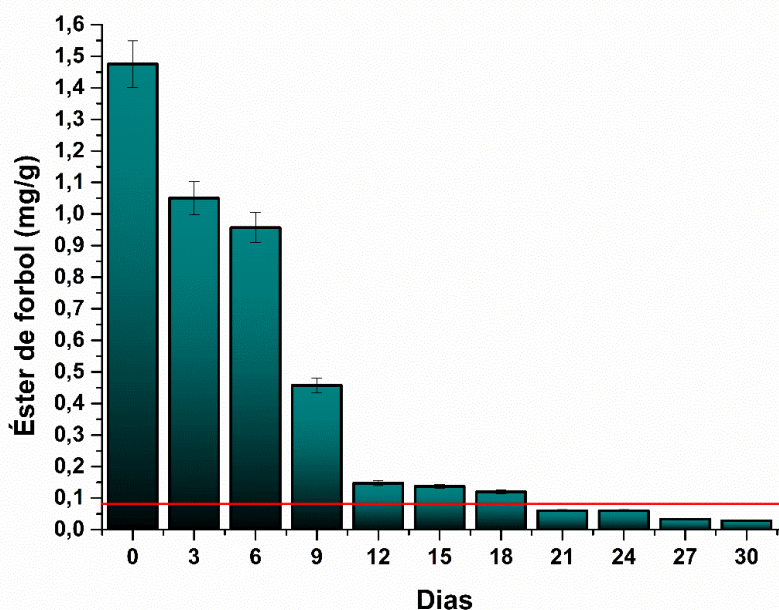


Figura 6. Degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* ao longo de 30 dias de cultivo. Concentrações abaixo da linha vermelha são consideradas atóxicas.

A maior taxa de degradação dos ésteres de forbol pelo macrofungo *P. pulmonarius* se dá nos primeiros 12 dias de cultivo. A curva de degradação foi usada como parâmetro para determinar os tempos de cultivo para RNA-seq, e a partir dos dados coletados foram escolhidos os dias 3, 7 e 11 de cultivo e, dessa forma, observar três pontos distintos frente a degradação.

4.2. Quantificação das atividades enzimáticas de *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica

Algumas enzimas extracelulares foram monitoradas, ao longo de todo o processo de cultivo microbiano, afim de estabelecer uma possível relação de degradação de ésteres de forbol e atividades hidrolíticas (proteases, esterases, lipases) e lignocelulóticas. O cultivo do EF88 foi realizado em torta atóxica (bioensaio NT) e tóxica (bioensaio T) possibilitando, dessa forma, analisar o perfil enzimático do fungo em dois substratos distintos: com presença de éster de forbol e na ausência de ester de forbol.

Dados da literatura apontam que esterases e lipases são responsáveis pela biodegradação desse diterpeno, dessa forma, a quantificação dessas enzimas foi realizada ao longo dos 30 dias de cultivo. No entanto, por meio dos métodos utilizados (espectrofotometria e titulação), não foram constatadas atividades dessas enzimas, em ambos substratos (bioensaio NT e T).

As oxidases quantificadas, lacase e MnP, apresentaram alta atividade ao longo de todo o cultivo (Figura 7). As lacases quantificadas no substrato com ausência dos ésteres de forbol (NT), atingiram maior atividade quando comparadas ao substrato tóxico; sendo o pico dessa atividade em apenas 6 dias de cultivo, enquanto na torta tóxica (T) a maior atividade foi identificada no último dia (30 dias). O perfil enzimático de MnP foi similar em ambos substratos, com aumento gradual em função do tempo, principalmente no substrato atóxico (NT), onde o pico da atividade ocorreu no último ponto (30° dia) e atingiu 170 U/mL (Figura 7). Ao contrário das lacases, a atividade de MnP foi superior no extrato enzimático do substrato tóxico, chegando a 700 U/mL no 24° dia, após esse ponto há um declínio da atividade enzimática (Figura 7). Não foram

detectadas atividades de LiP e oxidases do álcool veratrílico, por meio dos métodos usados.

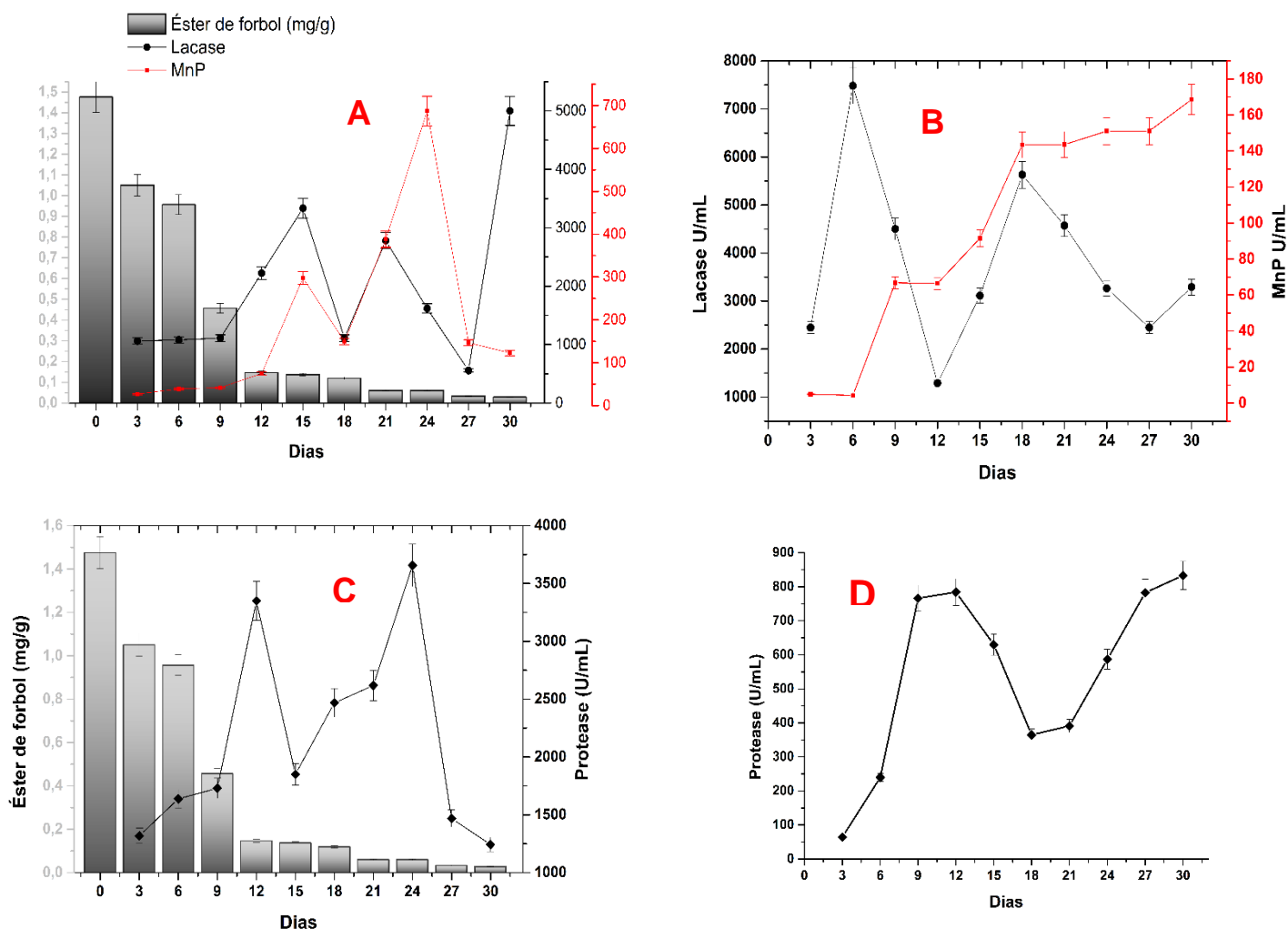


Figura 7. Degradação dos ésteres de forbol e atividade enzimática de *P. pulmonarius* ao longo de 30 dias de cultivo em torta de pinhão-mansó tóxica e atóxica. O gráfico A mostra os resultados da quantificação de enzimas oxidativas em substrato tóxico e o gráfico B no substrato atóxico (sem éster de forbol). Os gráficos C e D mostram a quantificação de proteases em substrato tóxico e atóxico, respectivamente.

As atividades de proteases (Figura 7) também permaneceram altas durante todo período avaliado. No extrato enzimático bruto obtido no cultivo tóxico, o pico dessa atividade foi observada no 24º dia (3500 U/mL), com drástico decréscimo nos dias subsequentes. As proteases quantificadas no extrato enzimático obtido do substrato atóxico, assim como as MnP, foram inferiores e com um perfil distinto em relação ao substrato tóxico. Houve um

aumento gradual das atividades proteolíticas a partir do 6º dia de cultivo, e apesar da redução observada no 18º dia, a atividade volta a subir até atingir o pico de 800 U/mL no último ponto.

As xilanases quantificadas apresentaram um pico na atividade enzimática no 12º dia de cultivo atingindo 22 UI/mL (Figura 8). Celulases totais (FPase) e Endoglucanase (CMCase) apresentaram apenas atividades basais como mostrado na figura 8.

Os gráficos sobre as atividades enzimáticas obtidas do substrato tóxico, enfatizam um comportamento semelhante sobre as diferentes classes de enzimas quantificadas. Tanto as enzimas oxidativas quanto as hidrolases aumentaram sua atividade enzimática somente após o 12º, quando os ésteres de forbol são degradados em 90% (0,4mg/g)

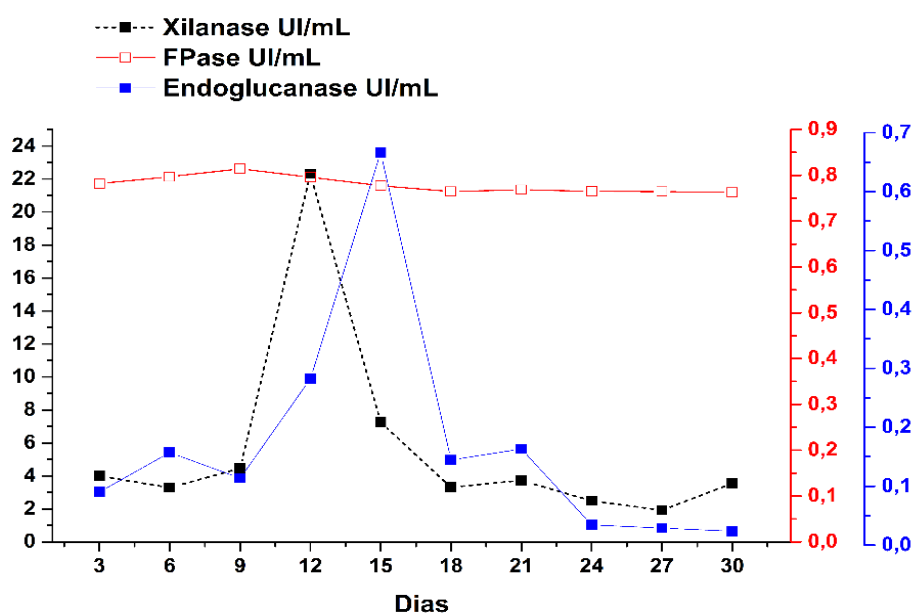


Figura 8. Quantificação de holocelulases ao longo de 30 dias de cultivo do fungo *P. pulmonarius* em torta de pinhão-mansó tóxica.

4.3. Degradação de ésteres de forbol por extratos enzimáticos brutos de *P. pulmonarius* EF88 obtidos em diferentes fontes de carbono

Os ésteres de forbol podem ser degradados por oxidação ou hidrólise (Gomes et al., 2018), acerca disso, foram conduzidos experimentos controles para avaliar a influência da azida sódica, água e agitação na degradação desse diterpeno. Fatores externos como luz e temperatura (28°C) também foram investigados e, isoladamente não são capazes de degradar os ésteres de forbol presentes na torta do pinhão-manso após 36h de exposição (Figura 9). O tratamento térmico (autoclave) também não teve influência na degradação do composto tóxico, o que já era esperado, uma vez que se trata de uma molécula termoestável (Aregheore et al. 2003; Gomes, 2015). A azida sódica degradou diretamente os ésteres de forbol, em cerca de 50% e sob agitação essa degradação aumenta para 60%.

A biodegradação dos ésteres de forbol pelo cultivo de *P. pulmonarius* foi comprovadamente demonstrada. No entanto, a ação direta do extrato enzimático bruto sobre essa molécula tóxica ainda não foi avaliada. Visando comprovar a degradação enzimática desse processo e investigar se a presença da própria molécula de éster de forbol induz a atividade de enzimas que promovam sua degradação, diferentes extratos enzimáticos brutos foram testados: 1) obtido do cultivo em torta de pinhão-manso tóxico; 2) obtido do cultivo em torta de pinhão-manso atóxico; 3) obtido do cultivo em meio sintético BDA.

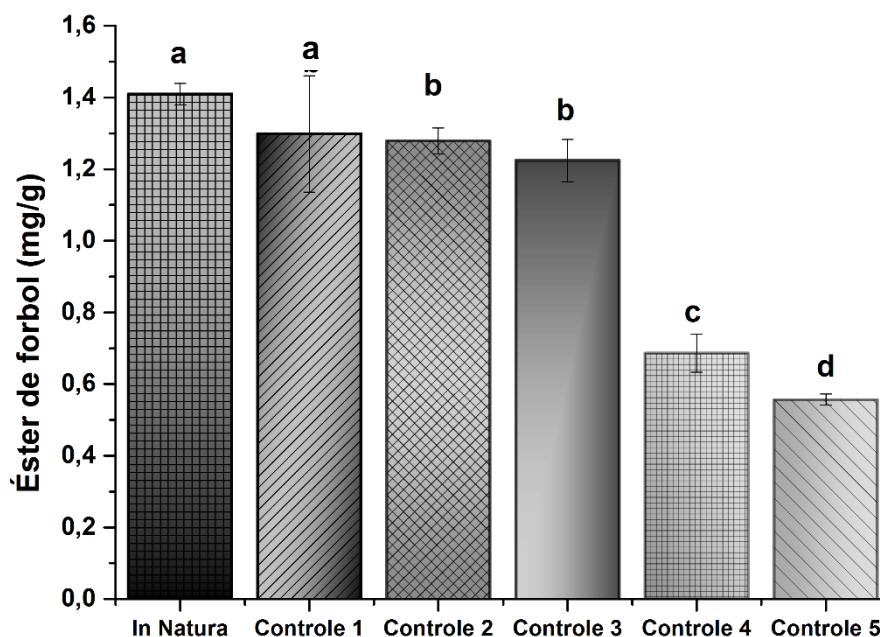


Figura 9. Controles externos aplicados a degradação dos ésteres de forbol. Controle 1- Torta de pinhão-mansão autoclavada 20 min; Controle 2- Torta de pinhão-mansão autoclavada + água Controle 3-Torta de pinhão-mansão autoclavada + água sob agitação; Controle 4- Torta de pinhão-mansão autoclavada + azida sódica; Controle 5- Torta de pinhão-mansão autoclavada + azida sódica sob agitação. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os extratos enzimáticos bruto foram obtidos após 7 dias de cultivo e usados diretamente na torta de pinhão-mansão sem adição de azida sódica. Em meio de cultivo com pinhão-mansão como fonte de carbono, o crescimento micelial foi mais rápido quando comparado ao meio de cultivo controle (BDA). No entanto, não houve diferença no crescimento entre os meios com presença e ausência de éster de forbol.

Os tratamentos apresentaram diferença estatística em relação a degradação dos ésteres de forbol (Figura 10), o extrato obtido no cultivo de *P. pulmonarius* EF88 em torta de pinhão-mansão tóxica foi o mais eficiente na degradação dos ésteres de forbol e o cultivo em meio sintético BDA foi o menos eficiente. Já em relação ao tempo de tratamento (18h e 36h) não houve

diferença estatística, com exceção ao extrato obtido no cultivo em meio BDA (Figura 10). No entanto, quando o experimento foi conduzido por 72h a degradação dos ésteres de forbol foi superior a 80% (dados não mostrados).

A eficiência na degradação dos extratos brutos, provenientes do cultivo a base de pinhão-manso, pode estar relacionada com as enzimas secretadas pela indução dos ésteres de forbol ou outros compostos químicos que compõe essa biomassa vegetal.

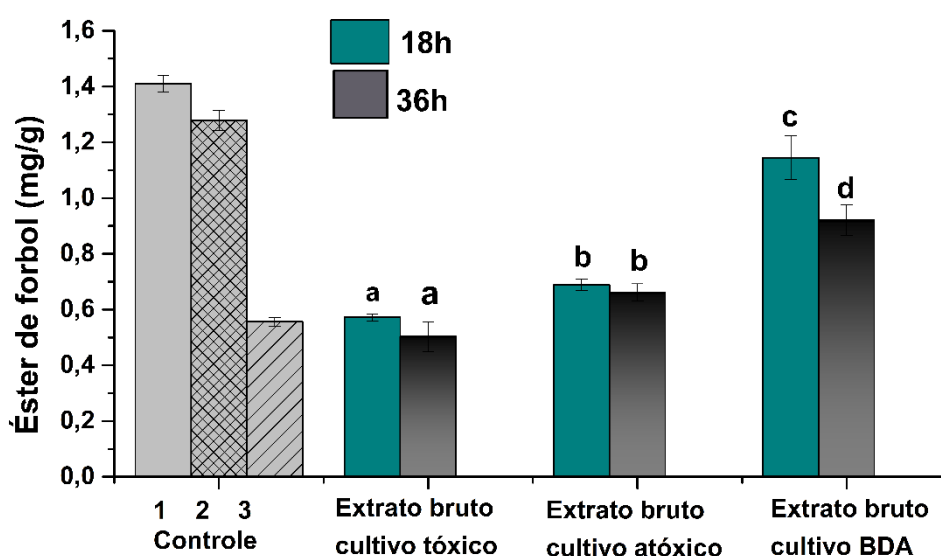


Figura 10. Influência do tratamento físico (autoclave), químico (azida sódica) e enzimático frente a degradação dos ésteres de forbol, presentes na torta de pinhão-manso. Controle 1- Torta de pinhão-manso autoclavada 20 min; Controle 2- Torta de pinhão-manso autoclavada + água; Controle 3- Torta de pinhão-manso autoclavada + azida sódica sob agitação. Extrato bruto 1: Extrato enzimático bruto (sem adição de azida sódica) obtido do cultivo de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica; Extrato bruto 2: Extrato enzimático bruto (sem adição de azida sódica) obtido do cultivo de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso atóxica; Extrato bruto 3: Extrato enzimático bruto (sem adição de azida sódica) obtido do cultivo de *P. pulmonarius* em meio sintético BDA. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5. Discussão

5.1 Degradação dos ésteres de forbol ao longo de 30 dias

Existe na literatura sobre destoxificação de TSPM uma lista de diferentes formas de tratamentos físicos e químicos para degradação dos ésteres de forbol, como uso de solventes (metanol e etanol), surfactantes e irradiação (Aregheore *et al.*, 2003; Martinez-Herrera *et al.*, 2006; Devappa *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Phasukarratchai *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2014). No entanto, esses tratamentos são de alto custo e em alguns casos não degradam de forma eficiente os ésters de forbol (Gomes *et al.*, 2018).

A inclusão de micro-organismos capazes de degradar substâncias tóxicas é uma estratégia promissora, e em alguns casos atingem maior degradação que tratamentos químicos (De Barros *et al.*, 2011; Luz *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2018). O processo de biodestoxificação da torta de pinhão-manso apresenta vantagens além da eficiência de degradação, como o menor custo, resíduo com alto valor nutricional agregado, e ainda é possível obter outros co-produtos a partir do mesmo cultivo, como cogumelos comestíveis ou enzimas de interesse biotecnológico (Gomes *et al.*, 2018).

No entanto, a cinética dos processos fermentativos é mais lenta e para tratamentos em larga escala podem ser necessárias grandes áreas. Além disso, é necessário aprofundar-se no estudo da segurança do produto final, uma vez que estes microrganismos podem secretar micotoxinas, principalmente os fungos pertencentes do filo *Ascomycota* como os gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*, conferindo ao produto toxicidade semelhante ou superior à previamente apresentada pelo produto *in natura* (Singh *et al.*, 2010).

Os fungos macro-basidiomicetos são amplamente empregados em processos de bioconversão, seja dos polímeros presentes em biomassas lignocelulosicas em açúcares fermentescíveis, como também na bioconversão de metais pesados e compostos xenobióticos (Kulikova *et al.*, 2011). Esses macrofungos também são usados para melhorar a qualidade nutricional de resíduos destinados a ração animal, uma vez que agem no enriquecimento

proteico, na degradação da lignina, aumento da fração hemicelulósica e da digestibilidade (Gomes et al., 2018). O cultivo desses fungos em resíduos agroindustriais abundantes torna-se uma alternativa lucrativa e economicamente viável (Owen et al., 2012).

A partir dos resultados da curva de degradação, apresentados na Figura 6, o processo de degradação dos ésteres de forbol está diretamente relacionada ao tempo de cultivo, ou seja, quanto maior o tempo de incubação maior será a degradação do composto tóxico. No entanto, ação biodegradativa ocorre nos primeiros dias de cultivo. O metabolismo destes fungos avançam sobre todas estruturas da parede celular (lignina e holocelulose) com passar do tempo, de forma a desconstruir toda biomassa e converte-los em estruturais metabolizáveis.

A cepa de *P. pulmonarius* EF88 usada no presente trabalho já foi previamente avaliada quanto a degradação de ésteres de forbol e a viabilidade de produção de cogumelos comestíveis (Gomes, 2015). Ao final de 60 dias de cultivo, *P. pulmonarius* foi capaz de degradar todos os ésteres de forbol presentes no substrato, restando apenas quantidades residuais do composto tóxico. O substrato destoxificado foi submetido a análises toxicológicas (ratos) e os animais avaliados não apresentaram nenhum sintoma de toxidez (Gomes, 2015). Outros autores também relatam o potencial de macrofungos na degradação de ésteres de forbol. Barros et al. (2011) mostraram que os fungos de podridão branca (inglês *White Rot fungi-WRF*) *Bjerkandera adusta* e *Phlebia rufa* foram capazes de degradar ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. Os fungos, foram inoculados em 30 g de substrato e o cultivo durou 30 dias em agitação mecânica. A degradação dos ésteres de forbol foram de 91 e 97% nos cultivos de *B. adusta* e *P. rufa*, respectivamente.

Da luz et al. (2014) usaram o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* como agente biológico para destoxificar a torta de pinhão-manso, e após 60 dias de cultivo os teores de ésteres de forbol foram reduzidos em 99%. O resíduo após ser submetido ao tratamento biológico, apresentou aumento do teor proteico (concentração da biomassa microbiana) e aumento da digestibilidade *in vitro*, e diminuição dos teores de lignina e celulose.

Fatores como espécie e origem da cepa usadas no processo de biodegradação da torta de pinhão-manso estão intimamente relacionados a

eficiência de degradação do composto tóxico em questão. Dessa forma, torna-se imprescindível o estudo prévio das espécies estudadas e as condições de cultivo como: tipo de cultivo (sólido ou submerso), temperatura, umidade e tempo de cultivo.

Bose e Keharia (2014) realizaram um *screening* de 10 fungos basidiomicetos referente a capacidade de degradar ésteres de forbol. Diferentes macrofungos como *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus florida*, *Trametes zonata*, *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Ganoderma lucidum* foram inoculados em erlenmeyer de 250 mL com 25g de TSPM, 70% de umidade a 30°C, durante 20 dias. Todos os fungos testados nesse experimento foram capazes de degradar os ésteres de forbol presentes na torta. Os melhores resultados foram obtidos com os macrofungos *G. lucidum* e *T. zonata*, com a degradação total dos ésteres de forbol, enquanto que os cultivos com os macrofungos *T. versicolor* e *T. gibbosa* foram detectadas apenas quantidades residuais. As quatro espécies de *Pleurotus* testadas por Bose e Keharia (2014) conseguiram degradar em torno de 70% dos ésteres de forbol presentes na TSPM, nas condições estabelecidas. Estes ainda observaram que o resultado menos eficiente foi do fungo *P. chrysosporium* que reduziu em apenas 45% dos ésteres de forbol. Esses fungos também foram capazes de aumentar os valores nutricionais da torta.

5.2. Atividades enzimáticas associadas a degradação de ésteres de forbol

Alguns trabalhos tem associado a biodegradação dos ésteres de forbol com enzimas microbianas, principalmente esterases e lipases. De acordo com Phengnuam e Suntornsuk (2013) a degradação dos ésteres de forbol por bactérias do gênero *Bacillus* é decorrente da atividade de esterases, enzimas que hidrolisam ésteres de cadeia curta. As atividades de esterases foram observadas nos cultivos bacterianos de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, que apesar de não apresentar total destoxificação, foram capazes de degradar o composto tóxico durante 5 dias de cultivo submerso. Outros trabalhos também sustentam a participação de esterases e lipases bacterianas na degradação desses diterpenos. Nakao *et al.* (2015) relatam que a enzima

esterase KM109 obtida da bactéria *Acinetobacter. calcoaceticus* é capaz de degradar os ésteres de forbol de pinhão-mansó.

Em contraste, Najjar *et al.* (2014) afirmam que as esterases não são os principais agentes degradadores do diterpeno tóxico. *Trichoderma harzianum* após 30 dias de cultivo em torta de pinhão-mansó, reduziu a concentração dos ésteres de forbol para 0.06 mg/g. Não foram detectadas esterases nesse cultivo, dessa forma, os autores consideram que a degradação desse mesmo composto pelo fungo *T. harzianum* foi decorrente da ação isolada de lipases. Outros trabalhos também confirmam a ação isolada de lipases frente os ésteres de forbol. Lipases extraídas da própria semente germinada de pinhão-mansó foi usada para degradar ésteres de forbol e após 12 horas de tratamento enzimático os ésteres de forbol foram reduzidos a níveis não tóxicos (Hidayat *et al.*, 2014).

Tanto no presente trabalho, quanto em trabalho anterior do grupo, descrito por Gomes (2015), não foram detectadas atividade de esterases e lipases ao longo do cultivo de *P. pulmonarius* EF88 em torta de pinhão-mansó. Esses dados indicam que os micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos e macrofungos) capazes de degradar os ésteres de forbol podem atuar de forma distinta nesse processo.

Outros autores apontam a participação de diferentes grupos de enzimas na degradação dos ésteres de forbol. Para Joshi *et al.* (2011) além das esterases, as proteases podem estar envolvidas na degradação dos ésteres de forbol por microrganismos, com essas enzimas agindo via hidrólise desse diterpeno e seus derivados. Kasuya *et al.* (2012) levantam a hipótese que a degradação dos ésteres de forbol por basidiomicetos ou WRFs ocorre por enzimas oxidativas responsáveis pela despolimerização da lignina, principalmente por lacases e manganês peroxidase (MnP). Devappa *et al.*, (2010) também sugerem que enzimas oxidativas estão envolvidas na degradação dos diterpenos presentes na torta de pinhão-mansó. Os autores informam que os próprios microrganismos presentes no solo degradaram por completo os ésteres de forbol do resíduo, em apenas nove dias.

Os macrofungos de podridão branca (WRF) são conhecidos pela habilidade de produzir enzimas extracelulares oxidativas que iniciam um processo de despolimerização da lignina, componente da parede celular

vegetal, onde estes microrganismos se desenvolvem. Esta capacidade permite estender seu uso para uma série de aplicações biotecnológicas, baseadas na degradação das estruturas de diversos compostos aromáticos presentes em alguns processos industriais ou efluentes (biorremediação). Partindo desse princípio, enzimas oxidativas podem desempenhar um papel importante na completa degradação dos ésteres de forbol, agindo por exemplo, na oxidação de produtos secundários.

As maiores atividades quantificadas ao longo de 30 dias de cultivo do basidiomiceto *P. pulmonarius* foram das enzimas proteases e lacases (Figura 7 A e C). No entanto, o EF88 quando cultivado em substrato com ausência dos ésteres de forbol apresentou perfil enzimático similar ao cultivo em torta de pinhão-manso tóxica. Quando comparadas as atividades em ambos substratos, a quantificação de proteases e lacases foi superior na torta tóxica, ainda assim, essas enzimas apresentaram alta atividade no torta atóxica (figura 7 B e D). No substrato atóxico também não foram detectadas atividades de lipases e esterases. Ressalta-se que os macro-basidiomicetos são naturalmente conhecidos pela capacidade de secretar enzimas lignolíticas (oxidativas) e que o substrato de pinhão-manso, rico em proteínas, pode estimular atividade de proteases.

Apesar da biodestoxificação de ésteres de forbol por enzimas oxidativas não estar completamente compreendida, a efetividade de inúmeros processos químicos oxidativos já foram descritos na literatura e esses processos incluem a degradação por peróxido de hidrogênio, por ozônio e raios gama (Gogoi *et al.*, 2014; Kuvshinov *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014)

A produção de hidrolases envolvidas na degradação de celulose e hemicelulose por basidiomiceto é relativamente baixa e varia de acordo com a espécie usada. Entretanto, Xiao *et al.* (2011) apontam que essas enzimas podem desempenhar papel na degradação dos ésteres de forbol. Segundo esses autores, o coquetel enzimático contendo celulasas e pectinases aumentou a eficiência de remoção dos ésteres de forbol por solvente orgânico (etanol 65%).

A torta de pinhão-manso como substrato para *P. pulmonarius* EF88 mostrou-se promissora para induzir a produção de enzimas com apelo industrial, como as lacases, MnP e proteases e xilanases. Demais trabalhos

encontrados na literatura corroboram para tal afirmativa. Como por exemplo, o fungo *Sporotrichum thermophile* ao ser cultivado em torta de pinhão-manso, sob condições otimizadas, foi capaz de produzir 1025 U/g de xilanase após 96h de cultivo (Sadaf e Khare, 2014). O cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* em torta de pinhão-manso foi eficiente para produção de celulasas (3974 U/g de substrato) e xilanases (6087 U/g de substrato), após 72h de incubação (Ncube *et al.*, 2012). O fungo *Scytalidium thermophilum* produziu xilanases termofílicas ao ser cultivado em torta de pinhão-manso, em condições otimizadas, a máxima atividade foi de 1455 U/g por substrato seco. Ao ser usada no cultivo da cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa PseA*, a torta de pinhão-manso foi eficaz para produção de lipases e proteases, com atividade máxima de 625 U/g e 1818 U/g por grama de substrato, respectivamente (Mahanta *et al.*, 2008).

Diante dos resultados apresentados no gráfico 8, o extrato enzimático bruto do EF88 possui ação direta na degradação dos ésteres de forbol, provavelmente em decorrência das enzimas presentes em tal extrato. Entretanto, não foi possível afirmar quais enzimas estão atuando nesse processo de biodegradação da molécula diterpenica.

6. Conclusões

O macro-basidiomiceto *P. pulmonarius EF88* possui ação eficiente na degradação dos ésteres de forbol presente em torta de sementes de pinhão-manso. A curva de degradação desse composto demonstrou que a atividade degradadora dos diterpenos ocorre nos primeiros dias de cultivo, e já em 21 dias de cultivo em estado sólido os níveis dos ésteres de forbol foram reduzidos a concentrações consideradas atóxicos. A partir dessa curva também foram selecionados os pontos para análise RNA-seq do transcrito e secretoma global/proteoma. Assim, foram definidos 3, 7 e 11 dias de cultivo para RNA-seq e 9 e 12 dias para análises proteicas. E dessa forma, analisar momentos distintos da resposta do metabolismo do fungo frente ao substrato e a molécula tóxica de éster de forbol.

As atividades enzimáticas, tanto hidrolases quanto oxidases, aumentaram após o 9º dia de cultivo, quando os ésteres de forbol foram

degradados em 80%. Ambos os substratos, torta de pinhão-manso tóxica e atóxica, mostraram potencial para produção de enzimas de interesse industrial como as lacases e proteases de *P. pulmonarius* EF88.

O extrato enzimático bruto do fungo *P. pulmonarius* EF88 também pode ser usado para degradação dos ésteres de forbol presentes na torta do pinhão-manso. No entanto, alguns parâmetros devem ser investigados afim de aumentar a eficiência de degradação e diminuir o tempo de processo. Esses parâmetros estão relacionados ao tempo de cultivo do fungo, método de obtenção do extrato enzimático bruto, temperatura e pH do processo de degradação.

Capítulo III: Expressão diferencial de genes do basidiomiceto *P. pulmonarius* EF88 em respostas a molécula tóxica de éster de forbol

Resumo

O mecanismo de bio-degradação do composto tóxico éster de forbol encontrado na biomassa gerada após a extração do óleo de *Jatropha curcas* ainda não foi esclarecido. A principal hipótese é que essa degradação seria decorrente da ação de enzimas secretadas pelos micro-organismos. Na literatura há relatos da participação de lipases e esterases na degradação direta desses diterpenos, outros autores descrevem ação de enzimas oxidativas, no entanto é possível que vários grupos enzimáticos estejam envolvidos na degradação total dos ésteres de forbol. Conhecer os genes envolvidos na degradação dos ésteres de forbol seria o primeiro passo para solucionar gargalos importantes relacionados a bio-degradação, como: diminuição do tempo de cultivo, aumento da eficiência de degradação de cepas pouco eficientes. Ferramentas moleculares como transcriptoma e proteoma são capazes de fornecer dados robustos que seriam capazes de identificar por meio de estratégias apropriadas, os genes e vias metabólicas envolvidas na degradação desse composto tóxico. Neste contexto, este capítulo teve objetivo identificar genes de *P. pulmonarius* EF88 envolvidos no processo de destoxificação, a fim de compreender e estabelecer o mecanismo de degradação dos EFs encontrados em tortas de pinhão-manso. A quantificação de atividades enzimáticas juntamente com a degradação dos EFs ao longo do cultivo sólido foram usados como parâmetros para determinar os pontos para análise transcritômica e proteômica. O transcriptoma do EF88 foi montado usando o software *Trinity* e foram mapeados um total de 23297 genes. Sendo que, 351 genes diferencialmente expressos foram detectados no cultivo *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica (T), dos quais 234 estavam superexpressos e 117 reprimidos. O resultados *in silico* de expressão diferencial gênica indicou que genes que codificam para proteínas como esterases, metaloprotease, citocromo P450, hidrofobinas e *heat shock* foram regulados positivamente pelo fungo no cultivo em torta de pinhão-manso tóxica. Dessa forma, os genes candidatos foram validados quanto sua expressão por RT-qPCR, e os resultados confirmaram a modulação positiva no cultivo tóxico. Em relação as análises de proteoma, tanto as metaloproteases quanto as esterases foram moduladas positivamente no cultivo em torta de pinhão-manso tóxica, quando comparados ao cultivo controle (torta não tóxica – NT). Assim, metaloproteases e esterases podem ser as principais enzimas envolvidas na degradação dos ésteres de forbol pelo macro-basidiomiceto *P. pulmonarius*. Além disso, as funções dos genes e proteínas anotados foram classificadas pelas análises GO. As análises de expressão diferencial de genes obtidos nesse presente trabalho, fornecem os primeiros dados relacionados os mecanismos envolvidos na biodegradação de ésteres de forbol por *P. pulmonarius* EF88. Esses dados podem ser usados para solucionar alguns gargalos relacionados a biodegradação dos ésteres de forbol, como tempo de cultivo e dificuldade de escalonamento.

Palavras-chave: éster de forbol; bio-destoxificação; expressão diferencial de genes; hidrofobinas; esterase; metaloprotease; citocromo P450.

Abstract

This chapter aimed to identify *P. pulmonarius* EF88 genes involved in the detoxification process in order to understand and establish the mechanism of degradation of PEs found in jatropha cake. The quantification of enzymatic activities along with the degradation of PEs throughout the solid culture were used as parameters to determine the points for transcriptomic and proteomic analysis. The EF88 transcriptome was assembled using the Trinity software and a total of 23297 genes were mapped. As a result, 351 differentially expressed genes were detected in *P. pulmonarius* cultivation in toxic jatropha (T), of which 234 were overexpressed and 117 repressed. The in-silico differential gene expression results indicated that genes encoding proteins such as esterases, metalloprotease, cytochrome P450, hydrophobins and heat shock proteins were upregulated by the fungus in toxic jatropha. Thus, the candidate genes were validated for their expression by RT-qPCR, and the results confirmed positive modulation in the toxic culture. Regarding proteome analyzes, both metalloproteases and esterases were positively modulated in toxic jatropha cake cultivation when compared to the control (non-toxic cake - NT) culture. Thus, metalloproteases and esterases may be the main enzymes involved in the degradation of phorbol esters by the macro-basidiomycete *P. pulmonarius*. In addition, the biological functions of annotated genes and proteins were classified by GO analyzes. The differential expression analyzes of genes obtained in this present work provide the first data related to the mechanisms involved in the biodegradation of phorbol esters by *P. pulmonarius* EF88. These data can be used to address some bottlenecks related to the biodegradation of phorbol esters, such as time of culture and scaling.

Key words: phorbol ester; bio-detoxification; differential gene expression; hydrophobins; esterase; metalloprotease; cytochrome P450.

1. Introdução

O mecanismo de biodegradação do composto tóxico éster de forbol encontrado na biomassa gerada após a extração do óleo de *Jatropha curcas* (torta) ainda não foi esclarecido. Uma das hipóteses sobre esse processo de biodegradação de ésteres de forbol por micro-organismos está envolto de enzimas extracelulares secretadas durante o crescimento microbiano. Na literatura há relatos da participação de lipases e esterases na degradação direta desses diterpenos, outros autores descrevem ação de enzimas oxidativas, no entanto é possível que vários grupos enzimáticos estejam envolvidos na degradação total dos ésteres de forbol.

Os terpenos são compostos químicos oriundos de processos do metabolismo secundário de plantas, por exemplo, e desempenham papel fundamental no seu desenvolvimento, interação ecológica e na defesa contra ataques de pragas e patógenos (Tholl, 2006; Jia *et al.*, 2016). Esses compostos químicos são amplamente utilizados em diversos processos industriais, tais como: produção de cosméticos, fármacos, produtos medicinais e inseticidas (Tholl, 2006; Maurya *et al.*, 2012; Zerbe *et al.*, 2014).

Segundo Vilanova *et al.*, (2014) a bioprospecção de micro-organismos capazes de degradar essas substâncias e seus derivados é de fundamental importância no que tange o cenário de biorremediação, uma vez, que esses compostos estão entre os principais poluentes oriundos dos processos industriais de celulose e papel.

Apesar da biodegradação dos ésteres de forbol ainda permanecer desconhecida, existe na literatura exemplos de investigações sobre genes microbianos relacionados a degradação de outros diterpenos, via cultivo de bactérias. Os genes envolvidos na degradação do diterpeno abietano por *Pseudomonas abietaniphila* foi bem caracterizado (Martin *et al.*, 1999; Martin e Mohn, 2000; Morgan e Wyndham, 2002; Smith *et al.*, 2004). *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 foi capaz de degradar abietanos não aromáticos e ácido dehidroacético, por meio da via dioxigenolítica, codificada pelo “cluster *dit*”. O

cluster dit codifica para uma ferredoxina e para subunidades α e β de dioxigenases (Martin e Mohn, 2000).

Conhecer os genes microbianos envolvidos na degradação dos ésteres de forbol seria o primeiro passo para solucionar gargalos importantes relacionados a biodegradação, como: diminuição do tempo de cultivo, e aumento da eficiência de degradação de cepas pouco eficientes. Ferramentas moleculares voltados a análise global do transcrito e proteoma possibilitam a identificação dos genes e vias metabólicas envolvidas na degradação desse composto tóxico, além de informações complementares importantes, como por exemplo a expressão de enzimas de aplicação industrial (Gomes *et al.*, 2018).

Os dados de degradação dos ésteres de forbol, apresentados no capítulo III, foram usados como parâmetros para escolher tempos de cultivo distintos que melhor represente a resposta do fungo frente a molécula tóxica de éster de forbol. Dessa forma, optou-se por analisar a resposta inicial do fungo quando exposto a altas concentrações de ésteres de forbol, analisar o ponto em que ocorre maior degradação desse diterpeno e após a degradação da molécula tóxica.

Com base na curva de degradação (Figura 6) os dias selecionados foram 3DAI, 7DAI e 11DAI para RNA-seq e 9DAI e 12DAI para as análises de proteoma. Sendo assim, esse capítulo versará sobre os os dados do transcrito de *P. pulmonarius EF88* em resposta à torta de pinhão-manso, obtidos por Next Generation Sequencing (NGS) e do proteoma/secretoma obtidos por espectrometria de massas.

2. Objetivo

2.1 Objetivos específicos do capítulo

- Analisar o transcrito e proteoma do basidiomiceto *P. pulmonarius* EF88 em respostas ao cultivo em torta de pinhão-manso tóxica (T), e identificar os genes e proteínas envolvidos na degradação dos ésteres de forbol. Selecionar as sequências gênicas diferencialmente expressas nas diferentes fases do crescimento do fungo, candidatas a degradação dos ésteres de forbol;
- Validar a expressão de genes candidatos e de interesse biotecnológico via qRT-PCR.

3. Metodologia

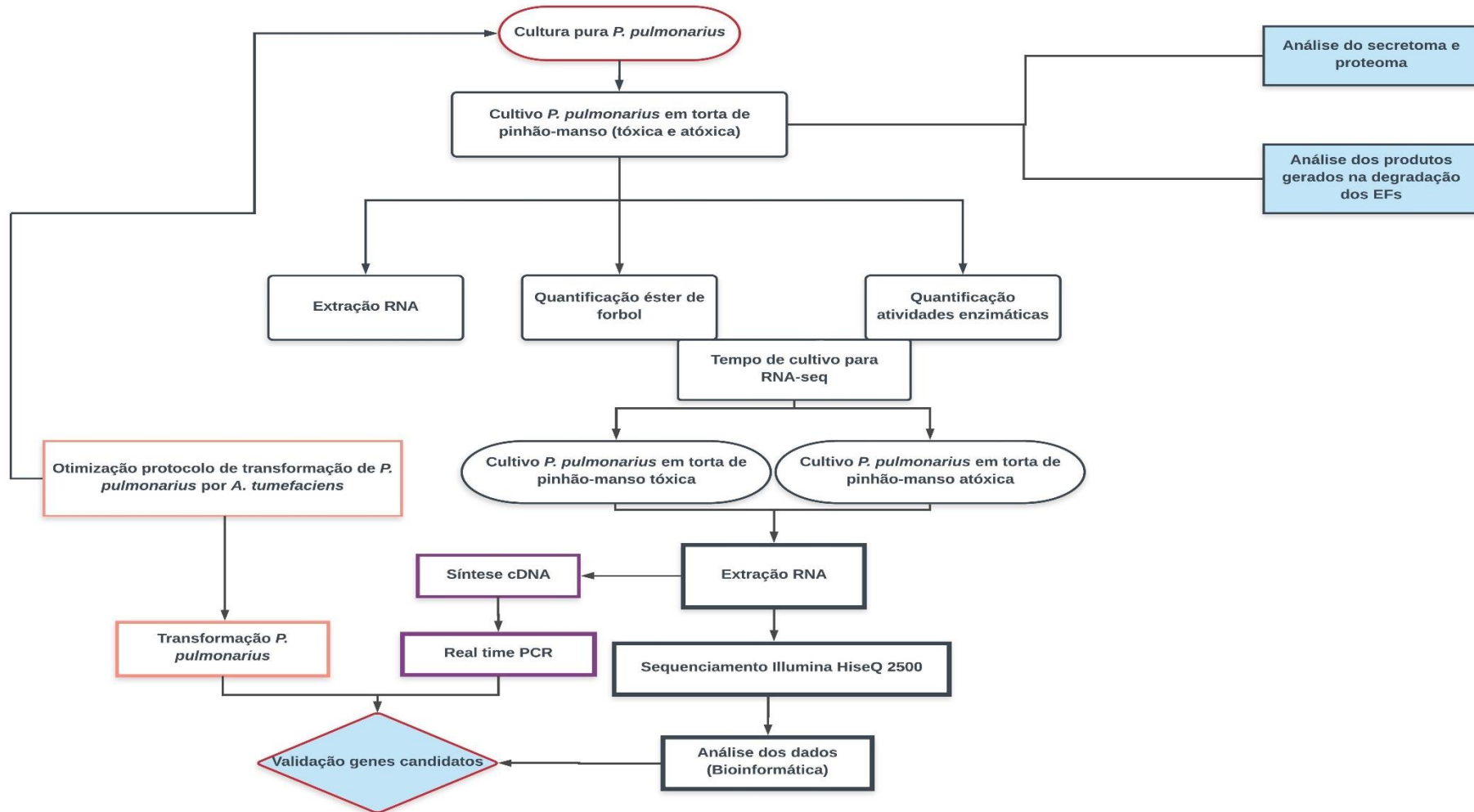


Figura 11. Fluxograma apresentado as estratégias utilizadas na obtenção do transcriptoma e proteoma do *P. pulmonarius* cultivado em tortas de pinhão-manso toxica e não-toxica..

3.1 *P. pulmoraius* EF88 e condições de cultivo

A cepa de *P. pulmonarius*, proveniente da coleção de basidiomicetos da Embrapa Agroenergia, foi preservada no método *Castellani* (Catella, 1967). Posteriormente, para a obtenção da cepa de trabalho um dos discos em estoque foi transferido para placas com meio de cultivo ágar pinhão-manso, incubados á 28°C por 7 dias. Para o cultivo em estado sólido foram usadas placas de petri de vidro (150mm x 20mm) com 100g de cada substrato (torta tóxica e atóxica) e umidade de 70%. O material foi esterilizado em autoclave á 121°C, 1 atm por 120 minutos. Após o resfriamento das placas, em câmara de fluxo laminar estéril, o micélio do fungo *P. pulmonarius*, previamente repicado (como descrito anteriormente) foi inoculado em torta de pinhão-manso tóxica (tratamento T) e em torta de pinhão-manso atóxica (tratamento NT). O cultivo ocorreu em estufa (BOD) com temperatura controlada (28°C). Foram retiradas amostras do micélio fungico em 3, 7 e 11 dias para extração de RNA. Todos os biensaiois foram realizados em triplicadas.

3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

A massa micelial do EF88 foi coletada em 3, 7 e 11 dias (DAI) após inoculação foi rapidamente congeladas com nitrogênio líquido. A extração e purificação do RNA total de cada tratamento, foi realizada por meio do kit INVITRAP® SPIN PLANT RNA (*Stratec Molecular GMBH, Berlin, Germany*), seguindo as instruções dos fabricantes. O RNA total foi tratado com DNase I (*New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA*) para remoção do DNA genômico residual.

A integridade de RNA total extraídos foi avaliado em gel de agarose (1%), revelado com 1µl de brometo de etídio, visualizado em transiluminador-UV e foto-documentado com câmara EDAS 290 (Kodak). Foi utilizado como referência o marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen®).

A quantidade e pureza dos RNAs totais foi estimada por análise da absorbância a 260 nm, utilizando como padrão 1 unidade A260=40 µg de RNA, por meio de espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA*), que pela razão A260/A280, indica possíveis

contaminações de RNA como: proteínas, sais caotrópicos (guanidina isotiocianato) ou fenol. Baseado na lei de Beer-Lambert, uma mudança linear na absorvância ocorre com a concentração do ácido nucleico. Uma relação OD 260/280 maior do que 1,8 foi considerado um indicador de RNA de alta qualidade. Taxas para A260/A230 próximas a 2,0 são indicativos de um RNA puro. Ao final dos processos, o RNA total eluído foi estocado a -80°C .

Foram preparados conjuntos contendo quantidades equimolares de RNA total a partir de três replicas biológica. No total, oito *pools* foram preparados, um para cada condição experimental. Esses *pools* de RNAs totais foram enviados para sequenciamento (item 3.3) e para síntese dos cDNAs que foram usados para validação dos genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol via RT-qPCR. Um total de 2 μg de cada *pool* de RNA total foi transcrito reversamente em cDNA usando Super Script II RT e Oligo (dT) 16-18 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A seguir uma ilustração do delineamento experimental (figura 12).

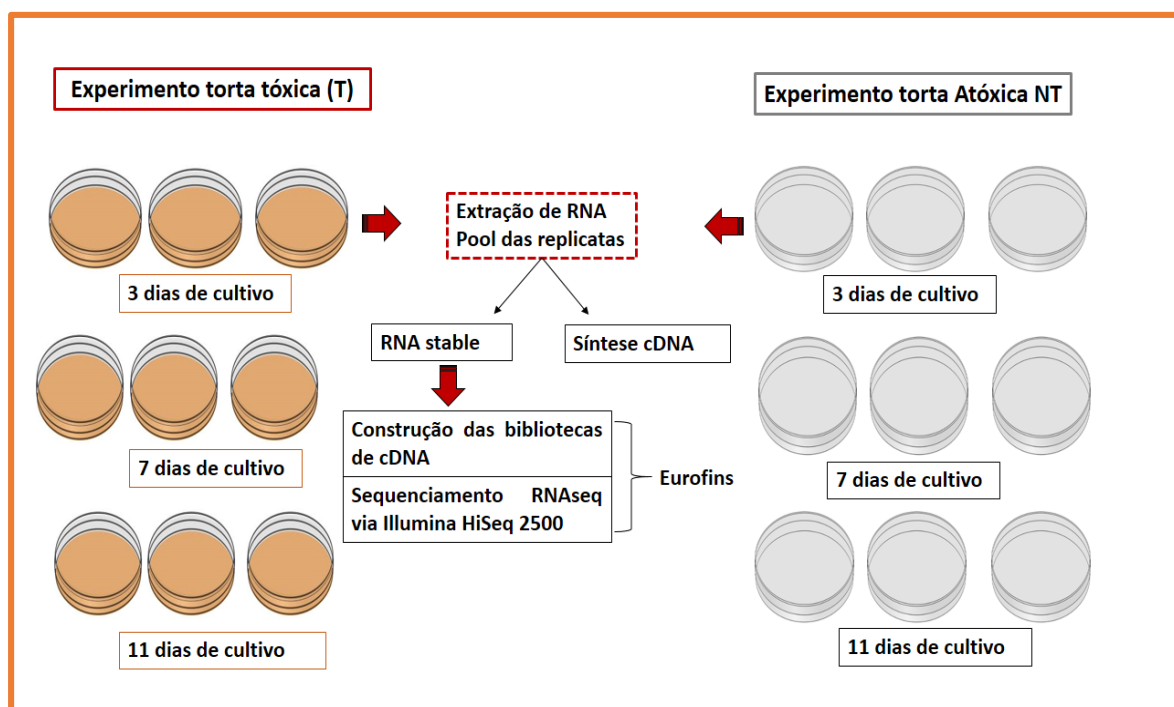


Figura 12. Esquema ilustrativo do delineamento experimental usado para o RNA-seq de *P. pulmonarius* EF88.

Tabela 2. Resumo do delineamento experimental para a análise do transcrito de *P. pulmonarius* EF88. 3DAI – 3 dias após inoculação; 7DAI – 7 dias após inoculação; 11DAI – 11 dias após inoculação; B1 – bioensio 1; B2 – bioensio 2; T – torta de pinhão- manso tóxico; NT – torta de pinhão-manso atóxica.

Tratamento	Flowcell do canal Illumina (replica técnica)
3DAI_T_B1	1
3DAI_NT_B1	1
7DAI_T_B1	1
7DAI_NT_B1	1
11DAI_T_B1	1
11DAI_NT_B1	1
3DAI_T_B2	1
3DAI_NT_B2	1
7DAI_T_B2	1
7DAI_NT_B2	1
11DAI_T_B2	1
11DAI_NT_B2	1
3DAI_T_B1	2
3DAI_NT_B1	2
7DAI_T_B1	2
7DAI_NT_B1	2
11DAI_T_B1	2
11DAI_NT_B1	2
3DAI_T_B2	2
3DAI_NT_B2	2
7DAI_T_B2	2
7DAI_NT_B2	2
11DAI_T_B2	2
11DAI_NT_B2	2

3.3 Sequenciamento RNAseq via Illumina HiSeq 2500

A construção das bibliotecas de cDNA e o sequenciamento foram realizadas na Empresa EUROFINS (Eurofins MWG Operon Kentucky, Louisville, Kentucky, EUA), utilizando a tecnologia Illumina (<http://illumina.ucr.edu/ht/>). Os *pools* de RNAs totais foram previamente quantificadas e transportadas em RNAsable (Biomatrica), de acordo com as instruções do fabricante. Após ressuspensão, a integridade do RNA foi avaliada utilizando o sistema do Agilent 2100 Bioanalyzer e RNA LabChip® kit (Agilent Technologies). Foram sequenciadas 12 bibliotecas em duas canaletas (replicas técnicas). O sequenciamento RNAseq via Illumina HiSeq 2500 foi conduzido

com sequenciamento *Paired-end* (2 X 100 bases), nos dois sentidos da fita de cDNA, usando a química *TruSeq RNA Chemistry v3*.

3.4 Avaliação da qualidade das sequências e filtragem dos dados

Inicialmente, um relatório das análises de qualidade de todas as sequências obtidas por RNAseq foi gerado por meio do programa *Fastq Quality Control Report (Fastq QC Report)*. Os fragmentos de sequências (*reads*) foram aferidos por qualidade superior a 20 e tamanho mínimo igual a 36 pares de bases (pb) utilizando o programa *Trimmomatic* (Bolger *et al.*, 2014). Para garantir que somente sequências com alta qualidade fossem selecionadas, optou-se pela eliminação de 5 nucleotídeos da extremidade 5' e 1 nucleotídeo da extremidade 3' de cada uma das sequências analisadas.

3.5 Mapeamento dos *reads* e identificação dos transcritos

O transcrito de *P. pulmonarius* EF88 foi montado por *de novo assembly* e para isso foram usados os softwares *STAR* e *gsnap* para mapear todos os *reads*. *SPAdes*, *Trinity* e *SOAPdenovo-Trans-31mer* foram utilizados para gerar *de novo* transcritos. Todos esses transcritos foram juntados pelo *EvidentialGene*. Como parâmetros utilizaram-se: i) penalidade para *mismatches*: 2; ii) penalidade para inserção: 3; iii) custo para deleção: 3; iv) fração mínima de comprimento: 0,90 v) fração mínima de similaridade: 0,95; v) número máximo de *hits* por *read*: 10; e distância entre *paired reads* determinada automaticamente.

3.6 Análise quantitativa da expressão gênica

A contagem do número de *reads* mapeados por módulos gênicos foram obtidas pelo *HTSeq-count* (Simon *et al.*, 2014), um software *Python* aplicado para o processamento de dados a partir de ensaios de sequenciamento de alto rendimento. Análises estatísticas foram empregadas para identificar genes com mudanças significativas no número de *reads* unicamente mapeados entre os tratamentos experimentais realizados. Os cálculos foram realizados com software *EdgeR* (Robinson *et al.*, 2010) e para

cada tratamento foram adotadas expressões com significância estatisticamente diferentes, aceitando como ponto de corte, valores menores que 0,01 para o valor de p ajustado para múltiplos testes utilizando o método Benjamini-HochBergh (padj), e valor da razão entre tratamentos T/NT na base logarítmica de 2 ($\log_2\text{FoldChange}$) maior que 1 ou menor que -1, ou seja, foram considerados como diferencialmente expressos os genes que tiveram expressão igual ou maior que duas vezes entre os tratamentos avaliados.

3.7 Anotação das sequências

A anotação dos genes foi realizada por homologia entre as sequências genômicas mapeadas e as presentes no banco de dados *Uniprot/SWISSPROT*. Para isso, foi utilizado a plataforma *Blast2GO*®, versão 2.8 (Conesa *et al.*, 2005). As sequências foram comparadas com aquelas presentes no banco de dados do *Uniprot/SWISSPROT*, empregando o algoritmo *BLASTp* e considerando um número máximo de 10 *hits* por entrada e o valor mínimo esperado de 10^{-6} ($Evalue \leq 1.10^{-6}$). Em seguida, realizou-se a anotação das sequências e seus respectivos termos de ontologia gênica (Gene Ontology, THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2000) usando os parâmetros padrões do *Blast2GO*. As análises de sub-representação e sobre-representação associadas aos genes e produtos de acordo com a categoria de ontologia gênica foram feitas com o teste hipergeométrico do programa FUNC (Prüfer *et al.*, 2007). Posteriormente, os termos redundantes foram eliminando e as categorias sumarizadas pelo programa REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>).

3.8. Validação dos genes de referência

Anterior a validação dos genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol via RT-qPCR, foi conduzido um experimento para garantir a eficiência dos genes de referência endogenos para esta condição específica (*Pleurotus pulmonarius* EF88 cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica). Para tal, foram usados os mesmos cDNAs (*pools*) sintetizados no item 3.2. Conforme mostrado na tabela 3, foram testados 10 genes de referência para *P. pulmonarius* na condição analisada (cultivo em torta T e NT).

3.9. Desenhos dos *primers* para validação dos genes de referência

Para o experimento de validação de genes de referência com expressão estável em *P. pulmonarius* EF-88, foram selecionados 10 genes candidatos que codificam para proteínas envolvidas em atividades celulares basais em espécies de *Pleurotus* sp. descritos na literatura (Tabela 3). O programa PrimerQuest Tool (*Integrated DNA Technologies - IDT*) foi usado para o desenho de todos os primers específicos para cada gene de referência candidato. As sequências gênicas foram usadas para desenhar *primers* curtos (20-22 pb), com Tm de 62°C, para amplificar produtos entre 90-120pb.

Tabela 3. Dez genes alvo usados na validação dos genes de referência de *P. pulmonarius* EF88 cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica.

Gene	Amplicon Length (pb)	Tm (C°)	ID	Referência
beta-tubulin	102	62	117235	Castanera et al., (2012); Garrido-Bazan et al., (2016)
GAPDH	102	62	1090672	Soden et al., (2001); Feldman et al., (2015)
VP	119	62	JX021525.1	<u>Este estudo</u>
MYP	121	62	AB353725	Yamaguchi et al., (2009)
LAC	118	62	AY836675.1	<u>Este estudo</u>
Actin 1	109	62	1087906	Castanera et al., (2012); Garrido-Bazan et al., (2016); Musa et al., (2017)
Phos	105	62	49987	Castanera et al., (2015)
EF-1	90	60		<u>Este estudo</u>
Mnp3	107	62	1089546	Castanera et al., (2015)
Trpho	113	60	EF645805.1	<u>Este estudo</u>

3.10 Real-time qPCR

A análise RT-qPCR da expressão dos genes de referência candidatos, foi realizada utilizando o kit iTaq™ universal SYBR® Green (Bio-Rad, CA, EUA). As amplificações por PCR foram realizadas em um termociclador *Real-Time PCR* da ABI StepOne® (Applied Biosystems, Foster City, EUA), utilizando três repetições experimentais independentes e três replicatas técnicas por amplificação. Para reações de PCR, as misturas continham 2 µL de uma diluição de 1:20 de cada cDNA estoque, 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 3) e 5 µL de kit iTaq™ *universal SYBR® Green*, com volume final de 10 µL. A amplificação por PCR foi conduzida utilizando um passo inicial de 52°C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 s, hibridização dos iniciadores e extensão a 60°C durante 60 s. A especificidade do *primer* foi verificada analisando a T_m (dissociação) de produtos amplificados usando o software SDS 2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Dados ΔR_n brutos foram aplicados para determinar a eficiência de RT-qPCR para cada gene usando o programa LinRegPCR, versão 2017.1. O mesmo programa foi usado posteriormente para calcular os ciclos médios de quantificação (Cqs) por gene.

3.11 Estabilidade de expressão e análise de expressão relativa dos genes de referência

Os dados de expressão para cada gene de referência candidato foram visualizados como um valor do ciclo de quantificação (Cq) de cada amostra de RNA. Este valor representa o número de ciclos de amplificação necessários para atingir um valor limite padrão para detecção durante a fase de amplificação exponencial da reação de PCR. A estabilidade de expressão de cada gene de referência candidato foi determinada usando os algoritmos *geNorm* (Vandesompele et al., 2002), *NormFinder* (Anderson et al., 2004) e *BestKeeper* (Pfaffl et al., 2004). O *GeNorm* também foi empregado para calcular a variação pareada ($V_n / n + 1$) entre cada gene de referência, para indicação do número ótimo de genes de referência para emprego na normalização da expressão gênica. Um ranking global dos genes candidatos foi realizado usando a ferramenta baseada na web *RefFinder* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>).

3.12 Validação dos genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol

Foram selecionados 21 genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol, que estavam diferencialmente expressos *in silico*, para validação via RT-qPCR. O *design* dos *primers* para cada gene seguiu os passos descritos no item 3.9 usando as sequências dos transcritos específicos gerados do transcriptoma de *P. pulmonarius EF88*. Os *primers* para os genes estão descritos na tabela 4. A PCR em tempo real seguiu os mesmos passos descritos no item 3.10.

A análise de expressão relativa dos genes candidatos foram obtidas pelo software qBase+. A normalização da expressão gênica foi realizada utilizando os genes referencia *Elongation Factor* (EF-1) e *Methioadenosine Phosphorylase* (Phos), resultante das análises descritas no item 3.11. Os resultados de expressão relativa foram analisados utilizando o programa *REST*®- *Relative expression programa tool* (Pfaffl et al., 2002) e ANOVA para comparar e gerar um nível de significância entre os grupos T e NT.

Tabela 4. Genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol selecionados para validação de expressão por RT-qPCR.

Gene	Proteína	Tamanho esperado do <i>amplicon</i>
HYD-1	Hidrofobina	114pb
POH2	Hidrofobina	100pb
Hydph7	Hidrofobina	90pb
Hydph8	Hidrofobina	92pb

G3Y416	Monooxygenase P450	114pb
WOLCODRAFT_167 027	Monooxygenase P450	100pb
patI	Monooxygenase P450	83pb
af510	Monooxygenase P450	100pb
Cyp4f5	Monooxygenase P450	113pb
ppoA_3	Monooxygenase P450	106pb
KUTG_07618	Monooxygenase P450	92pb
ppoA	Monooxygenase P450	107pb
DFR76_10551	Thiolase	100pb
SMAC_06893	Metalloprotease	96pb
CHU_2040	Esterase	108pb
sdhaf1A,	Succinate dehydrogenase	100pb
PLEOSDRAFT_509 2	Very-long-chain 3- oxoacyl-CoA	99pb
PLEOSDRAFT_1083 952	flavin reductase	105pb

axIA	alpha-xylosidase	123pb
NCU00937	β -glucuronidase	99pb

3. 13 Secretoma global

3.13.1 Cultivo de *P. pulmonarius* EF-88 em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica

A cepa de *P. pulmonarius* proveniente da coleção de basidiomicetos da Embrapa Agroenergia foi preservada no método *Castellani* (*Castella, 1967*). Posteriormente, para a obtenção da cepa de trabalho um dos discos em estoque foi transferido para placas com meio de cultivo ágar pinhão-manso, incubados á 28°C por 7 dias. Para o cultivo em estado sólido foram usadas placas de petri de vidro (150mm x 20mm) com 100g de cada substrato (torta tóxica e atóxica) e umidade de 70%. O material foi esterilizado em autoclave á 121°C, 1 atm por 120 minutos. Após o resfriamento das placas, em câmara de fluxo laminar estéril, o micélio do fungo *P. pulmonarius*, previamente repicado (como descrito anteriormente) foi inoculado em torta de pinhão-manso tóxica (bioensaio T) e em torta de pinhão-manso atóxica (bioensaio NT). O cultivo ocorreu em estufa (BOD) com temperatura controlada (28°C). Foram retiradas amostras no 9° dia de cultivo-9D e no 12° dia de cultivo-12D.

3.13. 2 Obtenção dos extratos proteicos bruto e preparo das amostras

Para obtenção do extrato proteico bruto, o substrato sólido foi diluído em água destilada gelada na proporção de 1:2. Dessa forma, 25g de substrato foram diluídos em 50 mL de água destilada e adicionados em erlenmeyer de 150 mL. A mistura foi então homogeneizada em shaker (agitação mecânica) durante 40 min a 5°C. O extrato enzimático bruto foi filtrado em funil de Buchner com tecido composto por 50% viscose e 50% poliéster.

As amostras dos extratos secretados foram dessalinizadas em filtração tangencial com filtros de 5 kDa e dosadas quanto a concentração de proteínas brutas (método BCA) e padronizados para uma concentração final de 100 µg/mL (todo o experimento foi realizado em triplicata). As amostras foram analisadas em 4 condições: cultivo tóxico e atóxico, em dois tempos de cultivo 9 dias (9D) e 12 dias (12D). As amostras preparadas previamente passaram por novas etapas de dessalinização, dosagem de proteínas (método BCA), redução com DTT, alquilação com iodoacetamida e digestão trípica. Os peptídeos obtidos foram dessalinizados em micro-colunas C-18 e quantificados usando-se o sistema *Qubit* (Rappsilber et al., 2007; Crowell et al., 2013).

De forma mais descritiva, alíquotas dos secretomas contendo 10 µg de proteína total foram precipitadas (Crowell et al., 2013), secas sob vácuo, reconstituídas em 150 µL de uréia (8 M), NaCl (7,5 M), bicarbonato de trietilamio 50 mM (TEAB), NaCl 7,5 mM, bicarbonato de trietilamio 50 mM (TEAB), ditioneitol 5 mM (DTT), pH 8,2 e incubado a 55 °C durante 25 min. Adicionou-se iodoacetamida a uma concentração final de 14 mM seguida de 40 min de incubação a 25 °C no escuro. Adicionou-se DTT numa concentração final de 10 mM e a mistura reacional foi então diluída cinco vezes em 25 mM de TEAB, pH 7,9, seguido por adição de CaCl₂ até uma concentração final de 1 mM. As amostras foram então digeridas com tripsina porcina modificada (1 µg por 50 µg de proteína total) durante a noite a 37 °C, seguindo da adição de ácido trifluoroacético (TFA) até uma concentração final de 0,5% (v / v). As amostras foram secas a vácuo, reconstituídas em TFA a 0,1% (v / v) e dessalinizadas usando StageTips (preenchidas com membrana Empore C18) (Rappsilber et al., 2007). Os peptídeos trípticos foram quantificados por fluorometria (*Qubit*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

3.13.3 Análise por LC-MS-MS

A análise cromatográfica e de espectrometria de massas foi realizada como descrito em Arshid et al. (2017), com adaptações descritas resumidamente a seguir.

Cromatografia:

Os peptídios obtidos foram injetados em sistema cromatográfico (Dionex Ultimate 3000 RSLCnano UPLC, Thermo, USA), configurado com coluna de aprisionamento (*trap column*) de 3 cm x 100 µm contendo partículas de C18 5 µm, 120 Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH), conectada em série à coluna analítica de 24 cm x 75 µm contendo partículas de C18 3 µm, 120 Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH). As amostras foram injetadas de forma a se obter 1 µg na coluna, submetidas a gradiente linear de eluição entre solventes A (ácido fórmico 0,1% em água) e B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) de 2% B a 35% B durante 155 min.

Espectrometria

As frações separadas no sistema cromatográfico foram eluídas diretamente na fonte de ionização de um espectrômetro de massas *Orbitrap Elite* (Thermo, USA), configurado para operar em modo DDA (*data dependent acquisition*), sendo que os espectros de MS1 foram adquiridos no analisador *Orbitrap*, com resolução de 120000 e faixa de m/z entre 300 e 1650. Os 20 íons mais intensos, acima do limite de intensidade de 3000 foram fragmentados, gerando espectros de MS2, ao analisador *ion trap* por CID (Kalli et al., 2013; Hawkridge et al., 2014). A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica (Andrews et al., 2011), favorecendo a identificação de peptídios menos abundantes.

3.13.4 Análise de dados

Os espectros obtidos foram analisados de forma qualitativa e quantitativa, de forma a permitir a identificação do conjunto total de proteínas detectáveis nas amostras, bem como avaliar quantitativamente as proteínas que apresentaram abundância relativa significativamente diferente entre as condições. Estas proteínas foram analisadas em maior detalhe, fornecendo informações sobre os componentes que melhor distinguem entre as condições e agrupadas quanto a vias, termos GO e interações. Os métodos utilizados, de forma geral, seguem a estratégia descrita em Arshid et al. (2017) com

adaptações detalhadas a seguir.

Análise qualitativa

O conjunto completo de espectros foi analisado utilizando-se o software *Peaks* versão 7.0 (BSI, USA) , com o banco de dados obtido do repositório *Uniprot* em outubro de 2018, filtrado para o gênero *Pleurotus*, tax. ID 5320, adicionado ao banco filtrado para a espécie *Jatropha curcas*, tax ID 180948, o banco combinado foi submetido à remoção de sequências redundantes utilizando-se software *FASTAtools*. A busca foi realizada com base em sequenciamento *de novo* e em PSM, tolerância para a massa do precursor de 10 ppm, e dos fragmentos de 0,5 Da, tolerância de até 2 clivagens perdidas, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. Além disso foram ativados os módulos de busca por modificações do banco *Unimod* com base em padrões de fragmentação, bem como busca de mutações pontuais (Zhang et al., 2012). Foram identificados 2776 grupos de proteínas de maneira confiável -FDR < 1%, pelo menos 2 peptídios.

3.13.5 Análise quantitativa

Os espectros foram analisados com auxílio do programa *Progenesis QI for Proteomics* (Valikangas et al., 2017), com o qual foi realizado o alinhamento dos cromatogramas, a quantificação por área dos picos extraídos (*XIC – extracted ion chromatogram*), normalização e análise estatística (ANOVA) dos eventos de MS1. Os eventos significativamente diferentes (p -valor <0,05) tiveram seus espectros de MS2 submetidos à identificação utilizando-se o programa *Peaks*, com os mesmos parâmetros descritos no tópico anterior. Após a inferência de proteínas, a quantificação foi refinada considerando a média dos peptídios atribuídos a cada proteína e foi realizada a análise estatística em nível de proteínas, sendo consideradas reguladas as proteínas que apresentaram ANOVA p -valor <0.05. Tais proteínas foram submetidas à análise multivariada de PCA e agrupamento em clusters de acordo com os perfis de abundância relativa.

4. Resultados

4.1 Expressão diferencial de genes do macro-basidiomiceto *P. pulmonarius* EF88 cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica

O sequenciamento Illumina HiSeq 2500, das 12 bibliotecas de cDNA do macro-basidiomiceto EF88, gerou um total de 110.515.557 pares de *reads* no bioensaio 1 e no bioensaio 2 um total 90.145.288 pares de *reads* (tabela 5). O transcrito do *P. pulmonarius EF88* foi montado pela estratégia *de novo assembly*, SPAdes, Trinity e SOAPdenovo-Trans-31mer foram utilizados para gerar *de novo* transcritos, todos os transcritos gerados foram juntados pelo software *Evidential Gene*, e assim identificados um total de 23.297 unigenes. Como forma de orientação e comparação dos dados obtidos nesse trabalho (unigenes), buscou-se na literatura trabalhos recentes relacionados ao transcrito de macro-basidiomicetos sequenciados por RNA-seq e montados *De novo* (tabela 6).

O *cutoff* usado para definir os genes diferencialmente expressos entre os tratamentos foram baseados no *Log2FoldChange* (≤ 2 ; ≥ 2) e *FDR* ($< 0,1$), seguindo padrões estabelecidos na literatura. O bioensaio NT foi usado como controle da expressão gênica, sendo assim, os DEGs identificados estão expressos pelo EF88 durante o tratamento T, em comparação com NT. Seguindo essas diretrizes, 351 genes diferencialmente expressos foram detectados no cultivo do *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica, dos quais 234 estavam superexpressos e 117 menos expressos em relação ao cultivo controle. O panorama geral de DEGs em cada tempo analisado foram descritos no diagrama de Venn (Figura 13).

Tabela 5. Dados do sequenciamento via Illumina Hiseq 2500 de *P. pulmonarius* EF88 cultivado em torta de pinhão-manso toxica e não-toxica

Biblioteca de cDNA	High quality reads (Q30)* Lane 1	High quality reads (Q30)* Lane 2
Bioensaio 1		
3DAI_T_B1	17427915	17429098
7DAI_T_B1	15274455	15256660
11DAI_T_B1	24733156	24764719
3DAI_NT_B1	12387032	12400348
7DAI_NT_B1	26647413	26647978
11DAI_NT_B1	14045586	14048639
Bioensaio 2		
3DAI_T_B2	15475575	15454642
7DAI_T_B2	12269506	12280299
11DAI_T_B2	20200518	20198008
3DAI_NT_B2	15441662	15433568
7DAI_NT_B2	9070858	9079182
11DAI_NT_B2	17687169	17677139

Tabela 6. Unigenes de diferentes basidiomicetos obtidos por sequenciamento de alto rendimento (RNA-seq) e montados de novo (de novo assembly).

Basidiomiceto	Unigenes	Referência
<i>P. pulmonarius</i> EF-88	23.297	<i>Este estudo</i>
<i>Peniophora</i> sp.	16.663	Otero et al. (2017)
<i>Coriolopsis gallica</i>	28.034	Chen et al. (2017)
<i>Pleurotus eryngii</i>	21.558	Fu et al. (2016)
<i>Flammulina velutipes</i>	20.157	Wu et al. (2018)

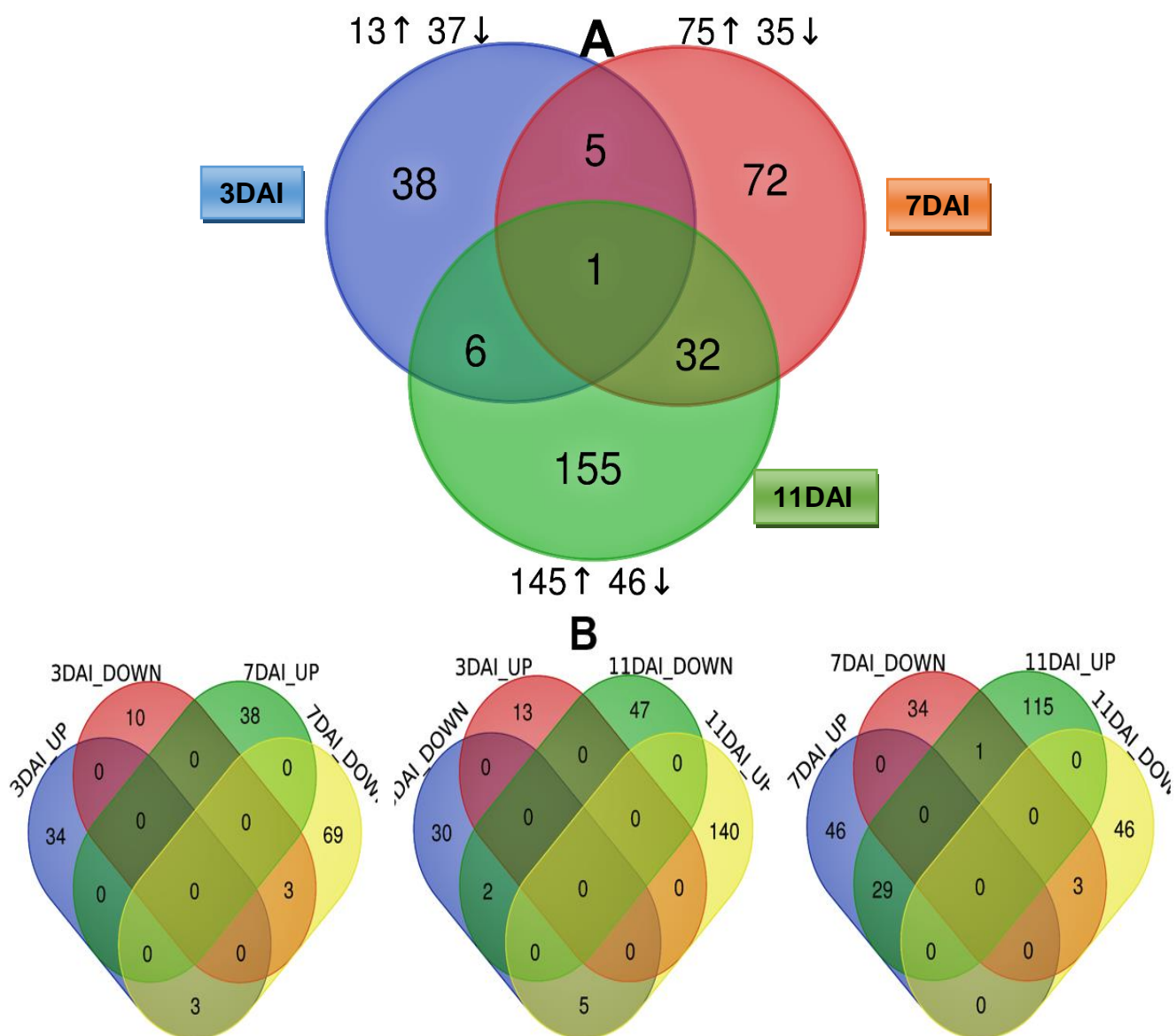


Figura 13. Diagrama de Venn, resumindo números de DEGs identificados nos tempos de cultivo 3, 7 e 11 DAI. A região de sobreposição do diagrama representa DEGs em comum nos cultivos de *P. pulmonarius* EF88. A: Diagrama de Venn Global; B: Diagrama de Venn comparativo entre os pontos analisados com DEGs reprimidos e superexpressos.

A plataforma *Blast2GO* foi usada para anotar os 23.297 genes expressos em resposta ao cultivo de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso, e foram encontrados *hits* para 12.207 genes, dentre os quais 6.804 estavam anotados (Figura 14). Dentre as seis principais classes de enzimas, genes que

codificam para hidrolases foram mais expressas, seguidas de transferase e oxidoreductase (Figura 15).

As categorias funcionais de *Gene Ontology* (GO) foram geradas para os 351 DEGs identificados por BLAST e categorizados de acordo com função molecular, processos biológicos e componente celular. Em 3DAI foram atribuídas 23 anotações relacionadas a função molecular, 11 a processos biológicos e 3 a componente celular (Figura 16). Em 7DAI a maior parte dos genes enriquecidos estão relacionados a processos biológicos ao qual foram atribuídas 20 anotações, 11 anotações para função molecular e 3 para componente celular (Figura 17). Em 11 DAI foram identificadas 22 anotações para função molecular, 11 referentes a processo biológico e 2 a componente celular (Figura 18).

Os GOs de função molecular atribuídos aos unigenes, de uma forma geral, desempenham funções relativas a síntese de proteínas e na atividade catalítica de enzimas oxirredutases e hidrolases. No que se refere aos GOs dentro de processos biológicos, as funções estão relacionadas ao metabolismo e síntese de ácidos graxos, processamento de proteínas, manutenção e regulação do material genético. GOs responsáveis pela resposta ao estresse, resposta a substâncias tóxicas e destoxificação estão enriquecidos em 11DAI.

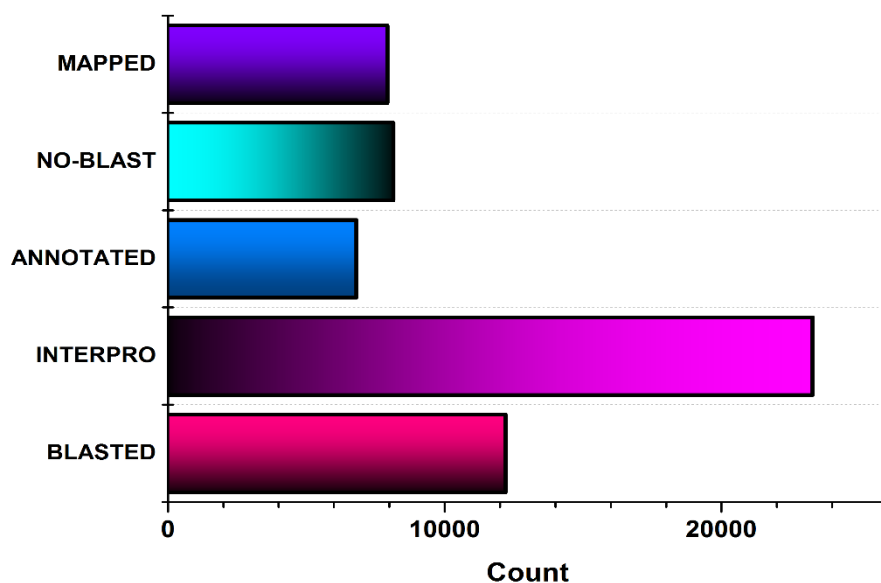


Figura 14. Total de seqüências anotadas e mapeadas por Blast2GO pelo banco de dados INTERPRO para o transcrito do *P. pulmonarius* cultivado em torta tóxica e atóxica de pinhão-manso.

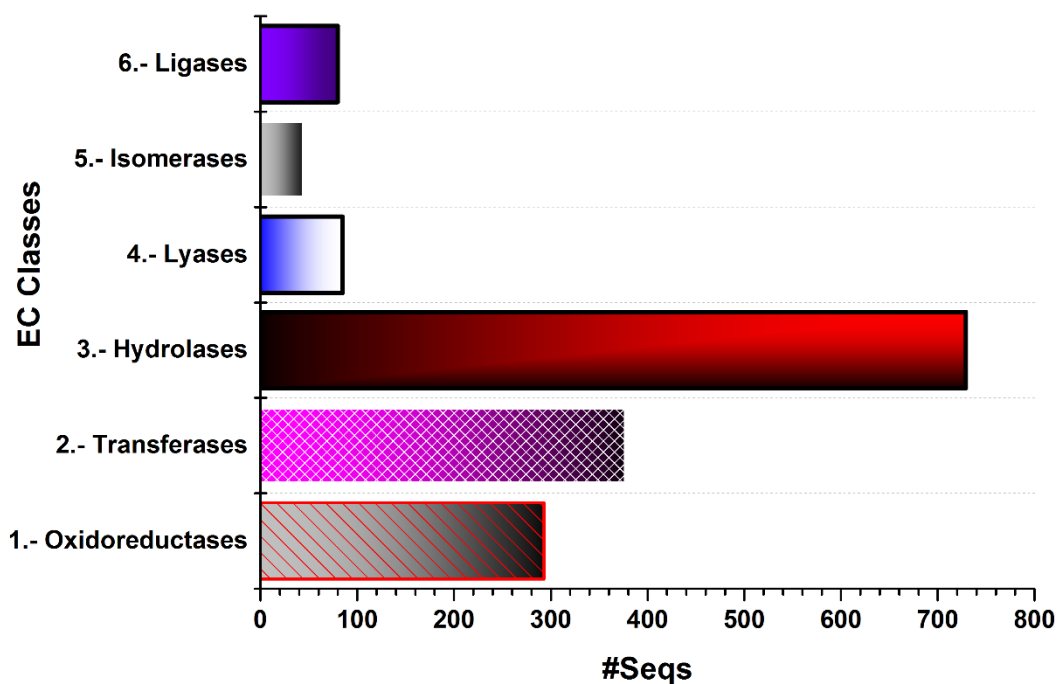
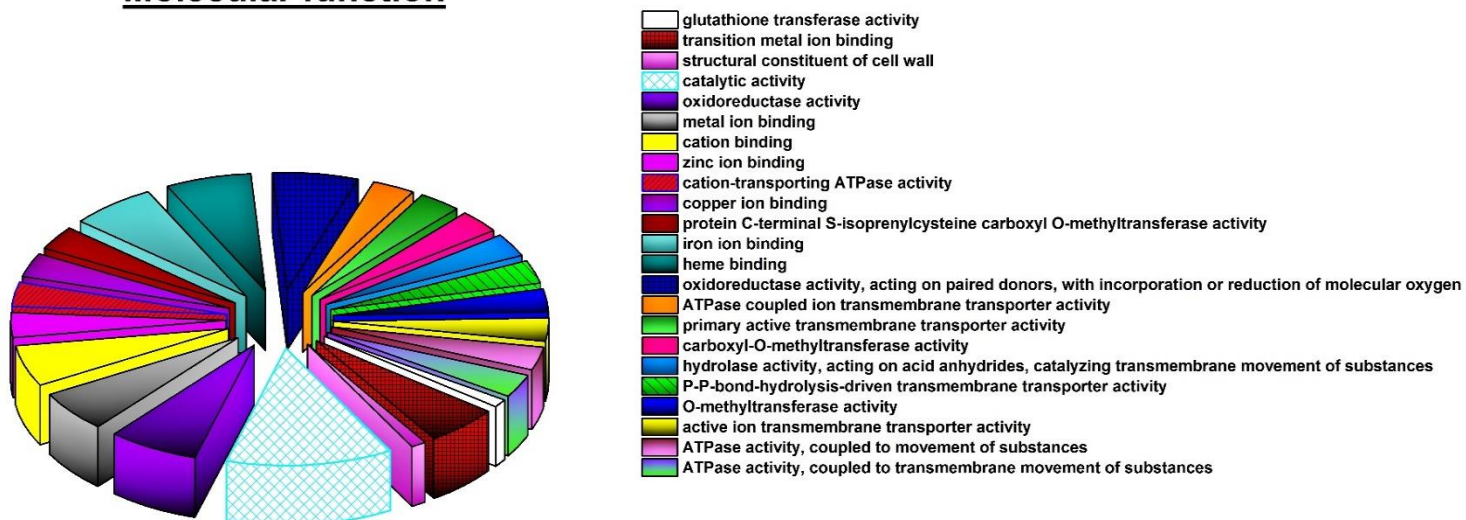


Figura 15. Número de seqüências referentes a grupos de enzimas identificados durante o crescimento de *P. pulmonarius* EF8 em torta de pinhão-manso.

Molecular function



Biological process

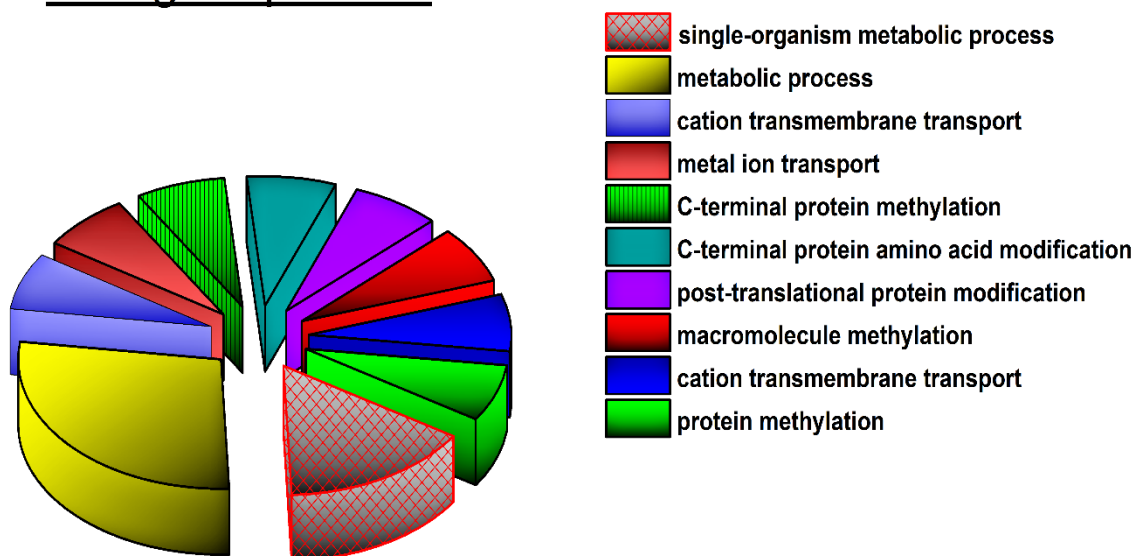
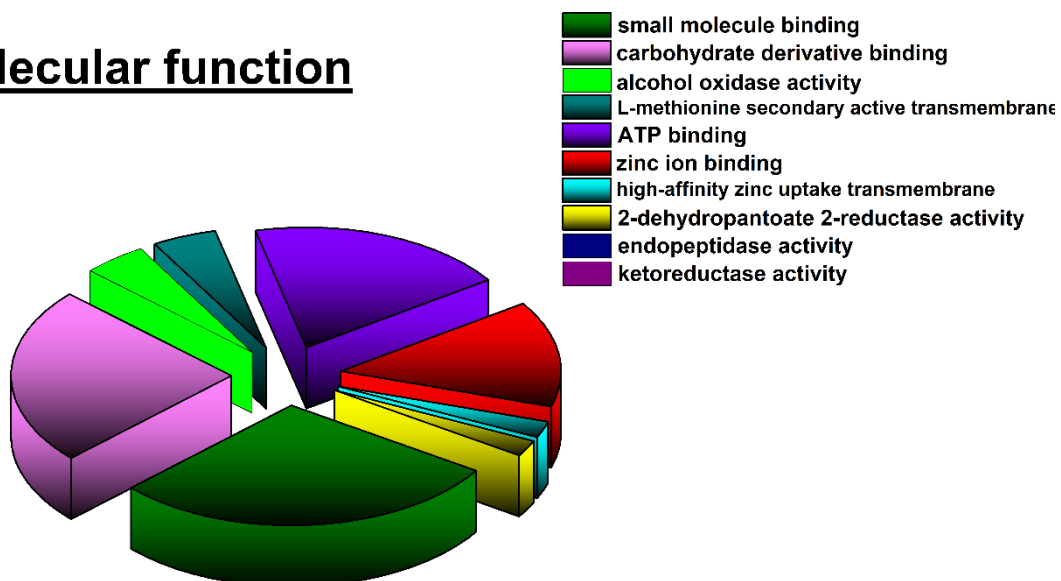


Figura 16. Ilustração das categorias de GO enriquecidos em 3DAI de *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso.

Molecular function



Biological process

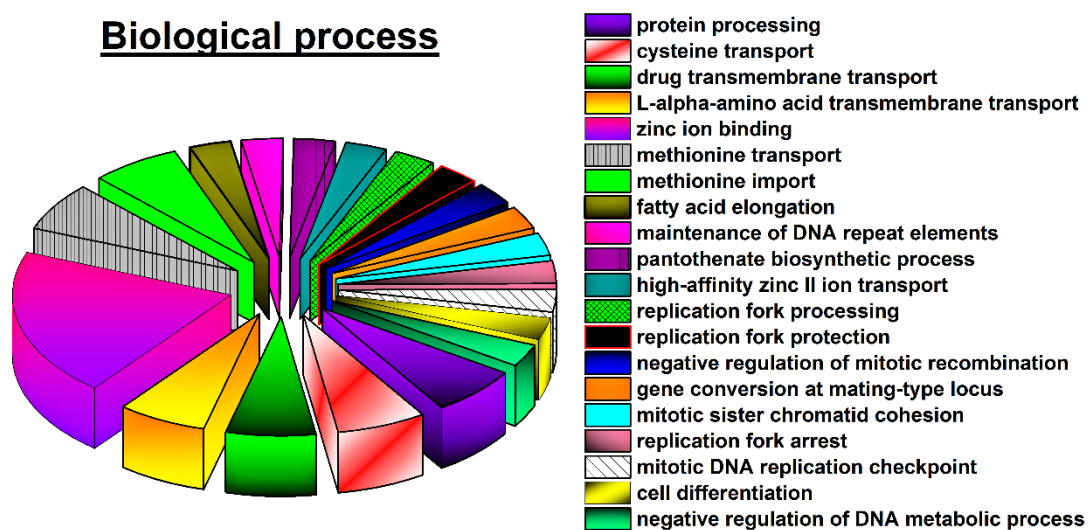
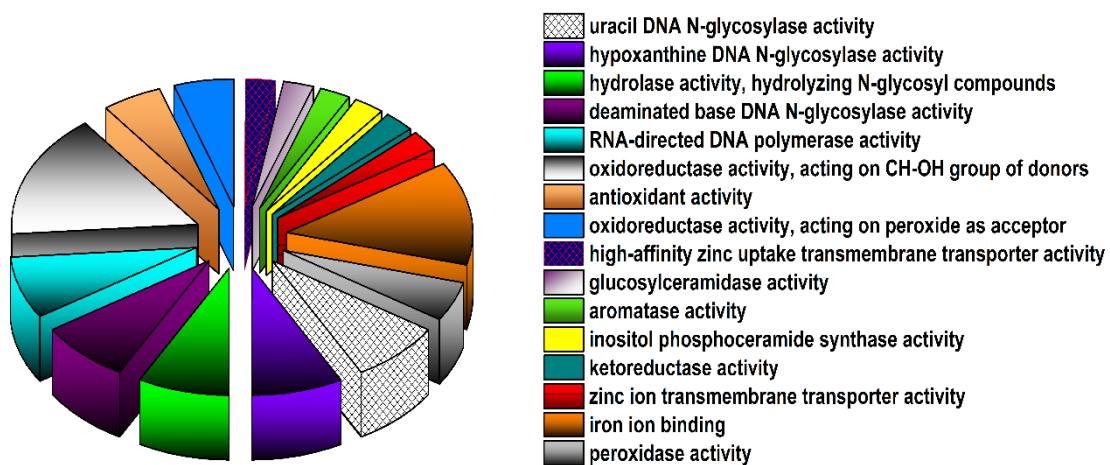


Figura 17. Ilustração das categorias de GO enriquecidos em 7 DAI de *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso.

Molecular function



Biological process

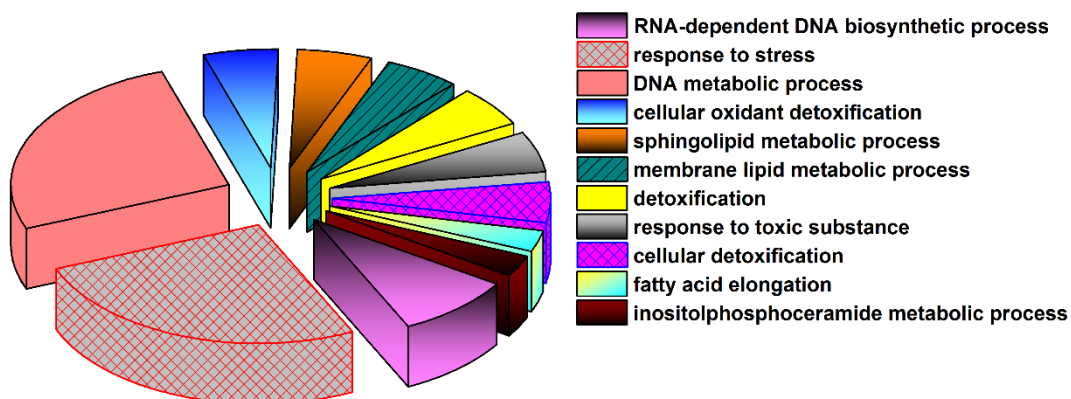


Figura 18. Ilustração das categorias de GO enriquecidos em 11DAI de *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso.

Os resultados mostraram que a expressão gênica foi diferente em cada dia analisado e esses dados estão ilustrados no *HeatMap* (Figura 19). As cores em tons amarelos representam que naquele ponto a expressão gênica foi positiva (genes superexpressos) e a cor vermelha representa uma expressão negativa (genes menos expressos). No primeiro ponto analisado-3DAI, a maioria dos genes estão menos expressos em relação ao tratamento controle (NT). Nos dias subsequentes (7 e 11 DAI) esse cenário foi alterado, ou seja a expressão gênica no tratamento tóxico foi maior em relação ao tratamento não tóxico, no entanto grupos gênicos estão menos expressos nos três momentos. Deste modo, pode-se observar também, que a expressão gênica em 7DAI e 11 DAI foi mais homogênea.

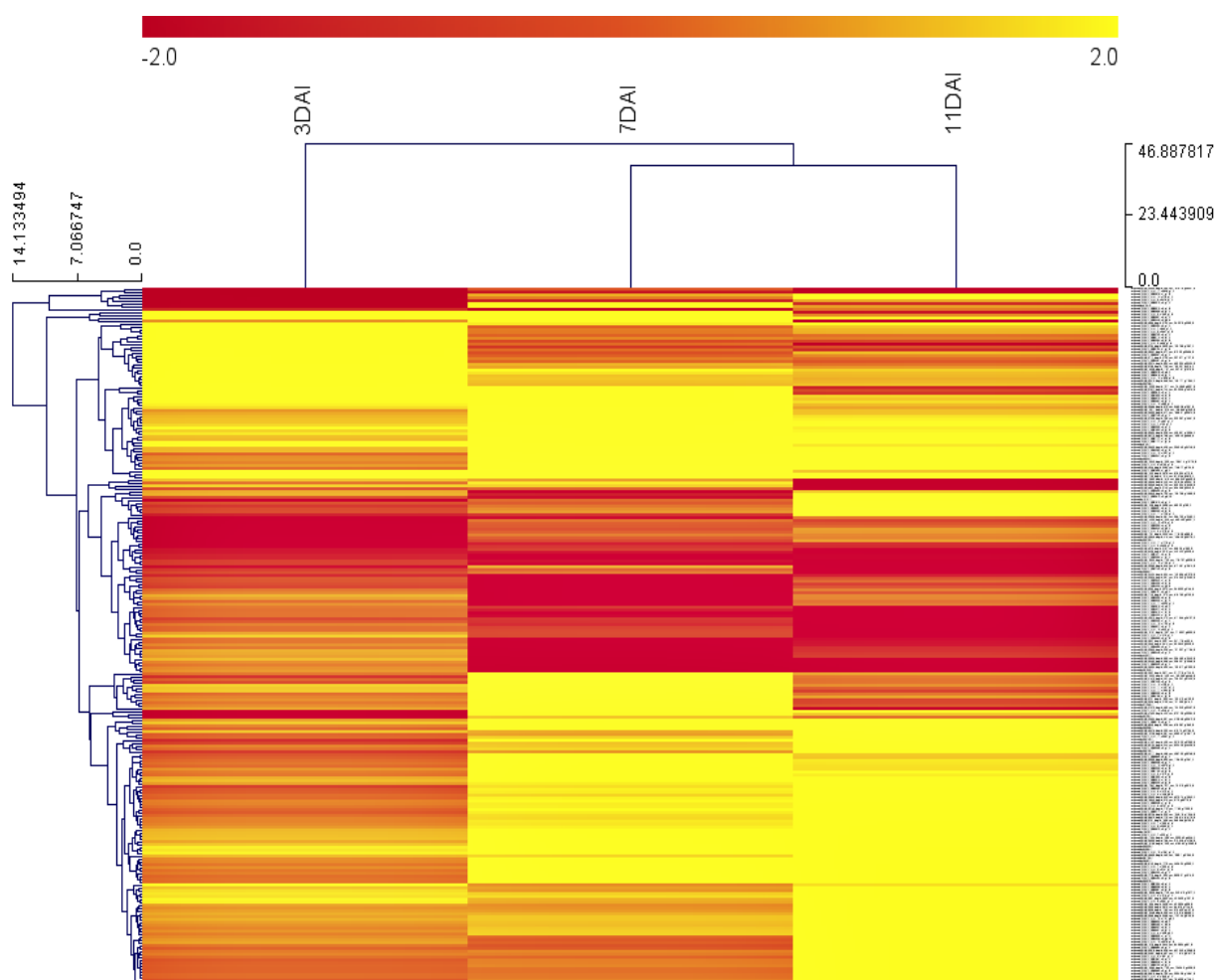


Figura 19. Heatmap dos genes diferencialmente expressos em *P. pulmonarius* durante 11 dias de cultivo em torta de pinhão-manso. A expressão gênica diferencial após o cultivo em torta tóxica foi relativo ao cultivo em torta atóxica.

Em 3 DAI apenas 50 genes foram diferencialmente expressos, dentre os quais 37 estavam regulados positivamente (*upregulated*) no tratamento NT e reprimidos (*downregulated*) no tratamento T, e apenas 13 regulados positivamente no tratamento T. Nesse primeiro ponto, três genes foram expressos mais de 5x. Esses DEGs codificam para, *Cu (+)-transporting ATPase*, *Furin-like cysteine-rich domain* e *Major intrinsic protein* (Tabela 7). Dois DEGs que codificam para proteínas hidrofobinas também foram reguladas positivamente no tratamento com torta de pinhão-manso tóxica. Assim como duas distintas monooxigenases do citocromo P450. Genes que codificam para proteínas importantes para o metabolismo de lipídeos, carboidratos e síntese de metabólitos secundários, como: *flavodoxin*, *acetylxyylan esterase*, *Acyl-CoA dehydrogenase*, *Glycoside hydrolase family 16 protein*, *alpha-D-phospho hexomutase*, *6-phospho glucono lactonases* e *pyro phospho hydrolases*, nesse primeiro momento, foram reprimidos ou menos expressos no tratamento T.

Tabela 7. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) no cultivo de *P. pulmonarius EF88* em torta de pinhão-manso tóxica em comparação com atóxico, durante o 3° dia de cultivo (3 DAI).

Transcritos	Proteína	LogFC	FDR
<i>Upregulated</i>			
evgsoapTRINITY_DN63324_c0_g1_i1	Cu-transporting P-type ATPase	7.65	3.5e-05
evgsoapTRINITY_GG_8_c2557_g1_i2	Furin-like cysteine-rich domain	6.66	0.022
evgsoapTRINITY_GG_2_c505_g1_i4	Major intrinsic protein	5.50	0.0116
evgsoapTRINITY_DN57622_c1_g2_i1	Hydrophobin SC3	4.82	9.9e-06
evgsoapTRINITY_DN62114_c0_g1_i1	Cytochrome P450 monooxygenase yanC	4.03	0.021
evgsoapNODE_27677_length_744_cov_63.3208_g15975_i0	Predicted protein	4.03	0.042
evgsoapNODE_11382_length_1453_cov_622.414_g5870_i0	Peroxisomal membrane protein PEX14	3.72	0.009
evgsoapNODE_15919_length_1159_cov_86.9547_g2758_i3	Protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase	3.06	0.0129
evgsoapNODE_33374_length_624_cov_583.204_g20404_i0	Beta 1,3 exoglucanase	3.053	0.011
evgsoapNODE_15306_length_1191_cov_327.81_g7979_i0	Hydrophobin SC3	3.036	0.0007
evgsoapNODE_2117_length_3130_cov_397.871_g1137_i0	Ostreolysin A6	2.36	0.034
evgsoapNODE_8786_length_1708_cov_180.031_g4315_i1	Multifunctional cytochrome P450 monooxygenase af510	2.27	0.033

evgsoapTRINITY_DN60104_c1_g1_i3	Uncharacterized protein	2.09	0.044
<hr/>			
<i>Downregulated</i>			
evgsoapTRINITY_DN63678_c1_g1_i3	dNTPase	-10.23	8.49e-12
evgsoaploc5134t3	Protein kinase-like	-8.12	0.0004
evgsoapTRINITY_GG_14_c778_g1_i1	6-phosphogluconolactonases (6PGL)	-7.87	0.002
evgsoapNODE_42229_length_489_cov_1675.78_g28031_i0	Uncharacterized protein	-7.87	0.002
evgsoapTRINITY_GG_8_c2476_g1_i1	Uncharacterized protein	-7.42	0.0069
evgsoapTRINITY_DN62310_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	-7.34	0.0126
evgsoapTRINITY_GG_11_c2636_g1_i1	Uncharacterized protein	-6.51	3.453e-10
evgsoapTRINITY_GG_7_c655_g1_i1	Uncharacterized protein	-6.37	0.0027
evgsoapTRINITY_GG_2_c1353_g1_i2	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRM61	-6.33	0.0031
evgsoapNODE_5865_length_2104_cov_35.2318_g3062_i0	Vegetative incompatibility protein HET-E-1	-6.30	0.0067
evgsoapTRINITY_DN63384_c0_g1_i2	Cytochrome P450 52E1	-5.33	0.031
evgsoaploc80720t1	Phosphopantetheine	-4.37	0.0053
evgsoapNODE_47520_length_434_cov_6701.98_g32964_i0	alpha-D-phosphohexomutase	-4.285	0.0040

evgsoapTRINITY_DN60732_c0_g1_i1	Acyl-CoA dehydrogenase	-3.91	0.0164
evgsoapTRINITY_GG_10_c246_g1_i1	Thymidylate synthase	-3.62	0.0318
evgsoapTRINITY_GG_2_c1316_g1_i3	Vacuolar protein sorting-associated protein 45	-3.31	0.0187
evgsoapNODE_23410_length_858_cov_148.171_g11854_i1	flavodoxin	-3.26	0.0040
evgsoapTRINITY_DN63282_c4_g1_i3	Uncharacterized protein	-3.21	0.0212
evgsoapTRINITY_GG_13_c1638_g1_i3	(S)-coclaurine N-methyltransferase	-2.97	0.031
evgsoapTRINITY_DN57602_c0_g1_i2	Uncharacterized protein	-2.93	0.094
evgsoapTRINITY_DN60516_c0_g1_i1	Vegetative incompatibility protein HET-E-1	-2.72	0.034
evgsoapTRINITY_DN63376_c0_g2_i1	Cutinase/acetylxylylan esterase	-2.67	0.0318
evgsoapNODE_2794_length_2830_cov_139.768_g1367_i1	Cytochrome P450 monooxygenase	-2.55	0.0475
evgsoapNODE_36007_length_577_cov_613.99_g22585_i0	Aldehyde oxidase GLOX	-2.54	0.0287
evgsoapNODE_22636_length_881_cov_265.783_g12460_i1	Alcohol dehydrogenase	-2.43	0.0318
evgsoapTRINITY_DN55940_c0_g2_i1	Alpha/Beta hydrolase	-2.42	0.0225
evgsoapNODE_1781_length_3334_cov_1116.08_g960_i0	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	-2.42	0.0002
evgsoapNODE_14399_length_1245_cov_560.482_g6991_i1	Alcohol dehydrogenase	-2.357	0.0160

evgsoapTRINITY_GG_8_c2598_g1_i2	pyrophosphohydrolases	-2.35	0.0187
evgsoaploc13101t1	4-O-methyltransferase 1	-2.327	0.0002
evgsoapNODE_49645_length_415_cov_1485.02_g29778_i1	Hydrophobin SC3	-2.32	0.0556
evgsoapTRINITY_GG_12_c976_g1_i2	Oxidoreductase Afly	-2.30	0.0166
evgsoaploc282120t1	Thioredoxin-like superfamily	-2.21	0.0391
evgsoapTRINITY_DN61004_c2_g1_i1	Uncharacterized protein	-2.18	0.0475
evgsoapTRINITY_DN60351_c0_g1_i4	Glycoside hydrolase family 16 protein	-2.14	0.0318
evgsoapTRINITY_DN58981_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	-2.04	0.0302
evgsoapTRINITY_GG_11_c1776_g1_i1	Nitrilase	-2.006	0.0558

No entanto, em 7 DAI foram identificados 110 DEGs, dos quais, 75 estavam regulados positivamente no tratamento T e 35 DEGs reprimidos ou menos expressos, em relação ao tratamento NT. Quatro DEGs que codificam para proteínas transportadoras e para uma oxirredutase (*2-dehydropantoate 2-reductase*) foram expressos mais de 11x no tratamento T (Tabela 7). Genes que codificam para proteínas como: Beta-glucuronidase, carbohydrate-binding module family 13 protein, glycoside hydrolase family 92, Alpha-xylosidase, aspartic-type endopeptidase, metalloprotease, metalloendopeptidase, Lipase class 3, Laccase-1 entre outras envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e peptídeos, foram superexpressas no tratamento T, de forma antagônica ao 3º dia de cultivo (tabela 8). Genes que codificam para Hidrofobinas, monooxigenases do citocromo P450 e proteínas *heat shocks* também foram moduladas positivamente. Em contraste, genes que codificam para proteínas como: *Translation initiation factor IF-2*, *Zinc finger (Znf)*, *Protein kinase-like*, *ABC transporter-like* foram reprimidas no tratamento em torta de pinhão-manso tóxica (T) e reguladas positivamente no cultivo controle (NT).

Já em 11 DAI o número de DEGs aumentou para 191, e a expressão gênica manteve o padrão observado no ponto antecedente, com 145 genes positivamente regulados no tratamento T, e 46 genes reprimidos. Como pode ser observado na Tabela 8, genes que participam do metabolismo de carboidratos, lipídeos e peptídeo foram expressos positivamente no substrato tóxico. Genes que codificam para proteínas hidrofobinas, monooxigenases do citocromo P450 e proteínas *heat shocks* também foram regulados positivamente no tratamento T, da mesma forma que em 7DAI. Genes envolvidos em processos como replicação, transcrição, síntese de proteínas mantiveram uma menor expressão em relação ao tratamento controle (tabela 9).

Tabela 8. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) no cultivo de *P. pulmonarius* EF88 em torta de pinhão-manso tóxica em comparação com atóxico, durante o 7° dia de cultivo (7 DAI).

Gene	Proteína	LogFC	FDR
<i>Upregulated</i>			
evgsoapTRINITY_DN56991_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	15.40	3.2e-07
evgsoapNODE_4866_length_2280_cov_810.653_g440_i4	2-dehydropantoate 2-reductase/Ketopantoate reductase	12.96	1.4e-13
evgsoapTRINITY_GG_7_c410_g1_i1	Uncharacterized protein	12.77	2.9e-09
evgsoapTRINITY_DN60801_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	11.61	0.0067
evgsoapNODE_18816_length_1018_cov_468.795_g9295_i1	Uncharacterized protein <i>P. ostreatus</i>	8.60	1.76e-05
evgsoaploc281705t1	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	6.51	0.0005
evgsoapNODE_11881_length_1414_cov_106.525_g6124_i0	cell surface protein	6.16	0.0214
evgsoapNODE_3297_length_2671_cov_31.7718_g1744_i0	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	6.055	0.0067
evgsoapTRINITY_DN58115_c0_g1_i1	Extracellular metalloprotease	4.69	0.0015
evgsoapNODE_38532_length_538_cov_3950.52_g24746_i0	transcriptional regulator	4.66	0.0285
evgsoaploc6140t1	carbohydrate-binding module family 13 protein	4.53	0.028
evgsoapNODE_12034_length_1402_cov_162.068_g5455_i2	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	4.47	0.0071
evgsoaploc56944t1	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	4.42	0.054

	PC15)		
evgsoapTRINITY_DN61177_c1_g1_i3	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	4.36	0.001
evgsoapTRINITY_GG_13_c1007_g1_i1	serum paraoxonases/arylesterases	4.29	0.0005
evgsoapTRINITY_DN60947_c2_g1_i4	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	4.26	0.0214
evgsoapTRINITY_DN61177_c1_g1_i4	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	4.03	7.863e-06
evgsoapNODE_41572_length_497_cov_708.007_g27439_i0	Nitrite reductase	3.91	0.0437
evgsoaploc282388t1	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	3.87	0.0071
evgsoapNODE_26773_length_766_cov_1529.43_g5858_i4	Putative ankyrin repeat protein	3.816	0.0102
evgsoapTRINITY_DN54364_c0_g1_i2	Predicted protein	3.73	0.0392
evgsoapNODE_19043_length_1009_cov_12641.4_g10176_i0	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	3.71	0.0091
evgsoapTRINITY_DN57602_c0_g1_i2	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	3.69	0.007
evgsoapNODE_33504_length_621_cov_4106.56_g20513_i0	Uncharacterized protein (<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15)	3.68	0.050
evgsoapTRINITY_GG_8_c2183_g1_i3	Beta-ketoacyl synthase	3.63	0.020
evgsoaploc282430t1	Beta-glucuronidase	3.58	1.87e-08

evgsoapTRINITY_GG_10_c246_g1_i1	Thymidylate synthase	3.57	0.028
evgsoapTRINITY_GG_11_c1491_g1_i1	Uncharacterized protein (Pleurotus ostreatus PC15)	3.48	0.0073
evgsoaploc84064t1	Methyltransferase	3.47	7.83e-06
evgsoapTRINITY_GG_10_c798_g1_i1	glycoside hydrolase family 92 protein	3.45	0.0224
evgsoapTRINITY_GG_2_c1128_g1_i1	class I heat shock protein	3.44	0.007
evgsoapTRINITY_DN55070_c0_g1_i1	carbohydrate-binding module family 13 protein	3.437	0.015
evgsoapTRINITY_DN60327_c1_g1_i2	Uncharacterized protein	3.42	0.00795
evgsoaploc79199t1	serine proteases	3.41	0.0083
evgsoapTRINITY_DN57622_c1_g2_i1	Hydrophobin SC3	3.36	0.039
evgsoapNODE_27677_length_744_cov_63.3208_g15975_i0	Predicted protein	3.31	0.079
evgsoapTRINITY_DN52296_c0_g1_i1	Uncharacterized protein (Pleurotus ostreatus PC15)	3.25	0.020
evgsoapTRINITY_DN64212_c1_g2_i8	Uncharacterized protein (Pleurotus ostreatus PC15)	3.22	0.0795
evgsoapNODE_25922_length_788_cov_213.948_g14726_i0	Uncharacterized protein (Pleurotus ostreatus PC15)	3.14	0.064
evgsoapTRINITY_DN60192_c1_g2_i7	growth factor receptor	3.11	0.071
evgsoapTRINITY_DN61038_c0_g1_i3	cytochrome P450 monooxygenase	3.09	0.07
evgsoapTRINITY_DN67746_c0_g1_i1	Uncharacterized transporter C1002.16c	3.08	0.0027

evgsoapNODE_62091_length_334_cov_1943.77_g47323_i0	PREDICTED: neurobeachin-like protein 2	3.08	0.067
evgsoapTRINITY_GG_10_c2072_g1_i1	U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	3.076	0.0001
evgsoapNODE_1433_length_3576_cov_876.904_g773_i0	Alpha-xylosidase A	3.056	0.08
evgsoapTRINITY_GG_10_c260_g1_i1	Aspartic protease	2.98	0.0065
evgsoapTRINITY_GG_7_c720_g1_i1	Uncharacterized protein	2.97	0.0001
evgsoapTRINITY_GG_14_c567_g1_i1	Ferredoxin	2.97	0.0013
evgsoapTRINITY_DN63601_c4_g1_i11	aspartic-type endopeptidase	2.96	0.058
evgsoapNODE_13911_length_1275_cov_196.655_g7242_i0	carbohydrate-binding module family 13 protein	2.95	0.013
evgsoapTRINITY_DN60587_c0_g1_i1	metalloendopeptidase	2.90	0.00976
evgsoapNODE_29929_length_693_cov_1125.23_g7351_i1	No hits found	2.86	0.0079
evgsoapNODE_27096_length_758_cov_233.967_g15551_i0	carbohydrate esterase family 16 protein	2.81	0.051
evgsoapTRINITY_GG_7_c330_g1_i1	lipoprotein LpqB	2.796	0.0503
evgsoaploc281124t1	Uncharacterized protein	2.61	0.026
evgsoaploc36467t1	Nuclear transcription factor	2.54	0.020
evgsoapNODE_30565_length_679_cov_2463.36_g7201_i2	Uncharacterized protein	2.46	0.0015
evgsoaploc10579t1	ZIP superfamily	2.41	0.089
evgsoapTRINITY_DN63399_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	2.39	0.001

evgsoapNODE_9731_length_1603_cov_123.413_g4102_i2	Lipase class 3	2.38	0.083
evgsoapTRINITY_GG_2_c1213_g1_i2	Uncharacterized protein	2.32	0.094
evgsoapNODE_35993_length_577_cov_1666.01_g22574_i0	glycoside hydrolase family 31 protein	2.37	0.002
evgsoaploc278283t1	Succinate dehydrogenase	2.33	0.074
evgsoapTRINITY_DN61823_c3_g1_i3	Heat shock protein 16	2.30	0.005
evgsoapNODE_6942_length_1938_cov_576.367_g1853_i2	COBW domain-containing protein	2.27	0.026
evgsoapTRINITY_DN62402_c0_g1_i2	MFS general substrate transporter	2.23	0.026
evgsoapTRINITY_DN61132_c0_g1_i2	Transcription factor HIVEP3	2.20	0.054
evgsoapTRINITY_DN63302_c0_g1_i2	Topoisomerase 1-associated factor 1	2.165	0.079
evgsoapTRINITY_DN61823_c3_g1_i6	Heat shock protein 16	2.15	0.026
evgsoapNODE_15306_length_1191_cov_327.81_g7979_i0	Hydrophobin SC3	2.14	0.017
evgsoapTRINITY_DN46650_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	2.11	0.016
evgsoapTRINITY_DN58573_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	2.106	0.0111
evgsoapNODE_44111_length_468_cov_4267.23_g29758_i0	Laccase-1	2.073	0.020
<hr/>			
<i>Dowregulated</i>			
evgsoapTRINITY_DN63828_c0_g1_i1	Glucan endo-1,3-alpha-glucosidase agn1	-13.44	0.0001
evgsoapNODE_4859_length_2281_cov_549.846_g2558_i0	SKP1/BTB/POZ domain	-8.22	1.8e-07
evgsoapTRINITY_DN62310_c0_g1_i3	2-carboxy-1,4-naphthoquinone	-7.11	0.000464

	phytyltransferase		
evgsoapTRINITY_DN62756_c2_g3_i5	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.3	-6.84	0.001
evgsoapTRINITY_DN60801_c0_g1_i5	Leucine-rich repeat domain superfamily	-4.63	0.00232
evgsoapNODE_34434_length_604_cov_149.685_g21278_i0	basic-leucine zipper (bZIP)	-4.38	0.011
evgsoapTRINITY_DN63844_c1_g1_i2	monocarboxylate transporter 1-like isoform X2	-3.95	0.008
evgsoapNODE_6657_length_1980_cov_138.398_g3295_i1	glycoside hydrolase family 115 protein [<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15]	-3.79	0.0041
evgsoapNODE_7830_length_1818_cov_37.6222_g4045_i0	Fucose permease	-3.59	0.026
evgsoapNODE_22097_length_899_cov_81.686_g12099_i0	Aromatic amino acid hydroxylase	-3.51	0.033
evgsoapNODE_22635_length_881_cov_275.953_g12460_i0	NADP-dependent oxidoreductase RED1	-3.33	0.006
evgsoapTRINITY_DN60468_c0_g1_i1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	-3.24	0.00873
evgsoapTRINITY_DN55868_c0_g1_i2	Quinoprotein alcohol dehydrogenase-like superfamily	-3.20	0.0023
evgsoapTRINITY_GG_11_c2093_g1_i1	Kinase-like protein	-3.17	0.085
evgsoapTRINITY_DN59202_c0_g1_i1	(R,R)-butanediol dehydrogenase	-2.91	0.00046
evgsoapTRINITY_DN62932_c1_g1_i7	Protein kinase-like	-2.89	0.0285
evgsoapNODE_3846_length_2515_cov_24.8675_g2034_i0	ABC transporter-like	-2.75	0.0734
evgsoapTRINITY_DN62522_c0_g1_i2	Uncharacterized protein	-2.66	0.063
evgsoapTRINITY_DN63507_c3_g5_i3	ATP dependent RNA helicase	-2.64	0.071

evgsoapNODE_22483_length_886_cov_326.331_g12358_i0	Uncharacterized protein	-2.61	0.054
evgsoapTRINITY_DN55868_c0_g1_i1	PE-PGRS family protein	-2.54	0.0545
evgsoapTRINITY_DN63922_c0_g1_i3	acetyl-CoA synthetase-like protein	-2.461	0.073
evgsoapNODE_20603_length_948_cov_121.207_g11165_i0	Major facilitator superfamily	-2.41	0.091
evgsoapNODE_7142_length_1910_cov_516.763_g3700_i0	Zinc finger (Znf)	-2.39	0.079
evgsoapTRINITY_DN61371_c0_g1_i2	High-affinity methionine permease	-2.35	0.001
evgsoapTRINITY_DN62965_c1_g1_i1	Calcium-transporting ATPase 3	-2.31	0.0010
evgsoapTRINITY_DN62446_c0_g1_i7	Thioredoxin-like superfamily	-2.26	0.051
evgsoapTRINITY_DN64228_c2_g1_i6	Uncharacterized protein	-2.231	0.06
evgsoaploc54907t1	Uncharacterized protein	-2.145	0.08
evgsoapNODE_3852_length_2514_cov_82.0643_g2038_i0	Translation initiation factor IF-2	-2.12	0.094
evgsoapTRINITY_DN60121_c0_g2_i1	Zinc finger (Znf)	-2.100	0.054

evgsoapTRINITY_DN64228_c4_g2_i9	Uncharacterized protein	-2.08	0.041
evgsoapNODE_2607_length_2901_cov_941.176_g423_i4	Elongation factor 2	-2.06	0.01
evgsoapNODE_6060_length_2073_cov_95.8023_g3155_i0	Tip elongation aberrant protein Tea4	-2.046	0.089
evgsoapTRINITY_DN63519_c1_g1_i3	Alcohol oxidase 1	-2.006	0.0082

Tabela 9. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) no cultivo de *P. pulmonarius EF88* em torta de pinhão-manso tóxica em comparação com atóxico, durante o 11° dia de cultivo (7 DAI).

Gene	Proteína	LogFC	FDR
<i>Upregulated</i>			
evgsoapNODE_12481_length_1370_cov_334.84_g6452_i0	ABC transporter substrate-binding protein	7.2	2.81e-07
evgsoapNODE_6942_length_1938_cov_576.367_g1853_i2	COBW domain-containing protein C15D4.05	7.14	1.4e-22
evgsoaploc282388t1	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	7.02	8.7e-18
evgsoapNODE_52475_length_393_cov_518.74_g37764_i0	Uncharacterized protein	6.37	1.846e-05

evgsoapTRINITY_GG_10_c1048_g1_i1	Aspartic protease	6.27	2.04e-05
evgsoapTRINITY_DN60192_c1_g2_i7	growth factor receptor	5.84	1.01e-12
evgsoapTRINITY_GG_11_c2867_g1_i1	Rhodanese-like protein	5.56	2.96e-15
evgsoapNODE_19706_length_981_cov_5963.57_g10611_i0	Cuticle-degrading protease	5.23	0.008
evgsoapTRINITY_DN58115_c0_g1_i1	Extracellular metalloprotease SMAC_06893	5.18	5.26e-35
evgsoapTRINITY_GG_5_c1791_g1_i1	Uncharacterized protein	5.05	2.51e-09
evgsoapNODE_33504_length_621_cov_4106.56_g20513_i0	Uncharacterized protein	5.01	8.3e-18
evgsoapTRINITY_DN62374_c0_g1_i4	Sphingomyelinase	4.82	3.2e-09
evgsoapTRINITY_GG_7_c410_g1_i1	Uncharacterized protein	4.47	8.4e-19
evgsoapNODE_41407_length_499_cov_3010.33_g27289_i0	Uncharacterized protein	4.32	5.7e-11
evgsoapTRINITY_DN59286_c0_g1_i1	Lipoxygenase 3	4.16	8.38e-17
evgsoaploc280142t1	Carbamoyl-phosphate synthase	3.95	7.3e-08
evgsoaploc280372t1	Uncharacterized protein	3.90	5.3e-18

evgsoapTRINITY_DN54424_c0_g1_i1	2-oxo acid dehydrogenase	3.82	2.4e-07
evgsoapTRINITY_DN54364_c0_g1_i2	Predicted protein	3.81	3.4e-22
evgsoapTRINITY_DN54424_c0_g1_i2	Uncharacterized protein	3.71	3.01e-09
evgsoapNODE_7779_length_1824_cov_8638.01_g4015_i0	Uncharacterized protein	3.67	9.88e-09
evgsoapNODE_60194_length_344_cov_6334.08_g45426_i0	Hydrophobin SC1	3.57	8.7e-18
evgsoapNODE_38532_length_538_cov_3950.52_g24746_i0	transcriptional regulator	3.56	1.3e-07
evgsoapTRINITY_DN62513_c0_g6_i12	Uncharacterized protein	3.51	5.85e-06
evgsoapTRINITY_GG_13_c1007_g1_i1	arylesterases	3.47	5.37e-05
evgsoaploc281124t1	Uncharacterized protein	3.458	3.8e-11
evgsoapTRINITY_GG_8_c2751_g1_i2	Uncharacterized protein	3.451	6.08e-07
evgsoaploc276309t1	T-complex protein 10	3.41	0.014
evgsoapNODE_45509_length_453_cov_1962.1_g31054_i0	Glutamyl aminopeptidase	3.409	2.5e-07

evgsoaploc56944t1	Uncharacterized protein	3.34	8.5e-13
evgsoapTRINITY_GG_1_c1990_g1_i6	Uncharacterized protein	3.31	0.001
evgsoapNODE_19043_length_1009_cov_12641.4_g10176_i0	Uncharacterized protein	3.28	1.31e-07
evgsoaploc282130t1	Carbohydrate-binding module family 13 protein	3.24	1.36e-07
evgsoaploc84064t1	methyltransferase	3.23	3.96e-17
evgsoapTRINITY_GG_14_c697_g1_i1	SAM-dependent methyltransferase	3.20	0.0001
evgsoapNODE_8140_length_1778_cov_4505.24_g3989_i1	Uncharacterized protein	3.19	1.8e-10
evgsoapTRINITY_GG_8_c2183_g1_i3	Beta-ketoacyl synthase	3.161	2.01e-07
evgsoapNODE_19188_length_1002_cov_5763.64_g10269_i0	Uncharacterized protein	3.15	7.49e-18
evgsoapNODE_25922_length_788_cov_213.948_g14726_i0	Uncharacterized protein	3.11	1.5e-15
evgsoapNODE_11036_length_1485_cov_2728.82_g5045_i2	Uncharacterized protein	3.11	1.79e-15
evgsoapTRINITY_DN62717_c1_g1_i7	Uncharacterized protein	3.05	0.0001

evgsoaploc77723t1	threonine-protein phosphatase PP-Z	3.04	0.065
evgsoapTRINITY_GG_10_c246_g1_i1	Thymidylate synthase	3.04	1.10e-06
evgsoaploc282430t1	Beta-glucuronidase	3.03	2.05e-17
evgsoaploc36467t1	Nuclear transcription factor	3.03	3.42e-11
evgsoapTRINITY_DN58573_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	3.03	9.54e-14
evgsoapTRINITY_GG_1_c1990_g1_i4	Uncharacterized protein	2.94	7.291e-14
evgsoapTRINITY_GG_12_c1251_g1_i1	Uncharacterized protein	2.94	3.41e-15
evgsoapTRINITY_GG_14_c778_g1_i1	6-phosphogluconolactonases (6PGL)	2.91	0.013
evgsoapNODE_29152_length_710_cov_11160_g17099_i0	Uncharacterized protein	2.87	1.43e-19
evgsoapNODE_5383_length_2180_cov_48.0499_g2810_i0	FAD-linked oxidoreductase patO	2.86	0.03
evgsoapNODE_41051_length_504_cov_97.1114_g26970_i0	Inositol phosphorylceramide synthase catalytic subunit aur1	2.860	0.03

evgsoapNODE_8376_length_1751_cov_51.2594_g4337_i0	Cytochrome P450 monooxygenase patI	2.84	0.027
evgsoapTRINITY_DN63930_c3_g1_i1	Uncharacterized protein	2.82	0.001
evgsoapTRINITY_GG_10_c2076_g1_i3	14-3-3 proteins	2.81	0.001
evgsoapNODE_38782_length_535_cov_123.658_g24965_i0	Uncharacterized protein	2.80	1.09e-05
evgsoapTRINITY_DN60947_c2_g1_i4	Uncharacterized protein	2.80	2.75e-07
evgsoapTRINITY_GG_8_c3080_g1_i1	DNA primase	2.80	5.75e-11
evgsoapNODE_7238_length_1895_cov_65.537_g3746_i0	Uncharacterized protein	2.79	0.007
evgsoaploc281533t1	Uncharacterized protein	2.75	3.10e-07
evgsoapNODE_9791_length_1598_cov_252.955_g4793_i3	cytochrome P450 monooxygenase af510	2.72	7.59795e-10
evgsoapNODE_5865_length_2104_cov_35.2318_g3062_i0	protein HET-E-1	2.71	0.001
evgsoapNODE_5269_length_2201_cov_78.5322_g1745_i1	protein HET-E-1	2.71	1.80646e-05
evgsoapNODE_8098_length_1783_cov_270.533_g4197_i0	Aldehyde dehydrogenase	2.71	7.478e-06

evgsoapTRINITY_GG_2_c1621_g1_i1	Helicase	2.69	8.2848e-10
evgsoapNODE_26570_length_772_cov_708.614_g15178_i0	Uncharacterized protein)	2.69	0.0001
evgsoapTRINITY_DN62963_c2_g1_i1	Homocysteine synthase	2.681	0.0008
evgsoapNODE_20735_length_943_cov_1348.18_g11245_i0	Uncharacterized protein	2.66	9.6e-10
evgsoapTRINITY_GG_7_c330_g1_i1	lipoprotein LpqB	2.65	1.6e-06
evgsoapNODE_7108_length_1914_cov_67.3755_g3679_i1	Uncharacterized protein	2.63	0.071
evgsoapNODE_23816_length_846_cov_537.043_g13258_i0	Plant-expansin-like protein	2.62	0.00012
evgsoaploc66177t1	Aspartic peptidase	2.62	1.3e-08
evgsoapNODE_4045_length_2464_cov_1756.77_g2134_i0	Aromatic amino acid aminotransferase	2.61	2.52e-11
evgsoapTRINITY_DN61177_c1_g1_i4	Uncharacterized protein	2.56	0.001
evgsoapNODE_7444_length_1867_cov_47.8477_g3847_i0	isoprenoid synthase	2.55	0.036
evgsoapTRINITY_DN58327_c0_g2_i1	threonine-protein kinase PLK4	2.55	0.003

evgsoapNODE_11004_length_1488_cov_3929.53_g5045_i1	Carbohydrate esterase family 4 protein	2.54	5.8e-15
evgsoapNODE_26820_length_765_cov_100.851_g15356_i0	Glycoside hydrolase family 61 protein	2.53	0.008
evgsoapTRINITY_GG_11_c1748_g1_i1	Ribonuclease T1	2.52	0.007
evgsoapNODE_16238_length_1142_cov_343.519_g7877_i1	Uncharacterized protein	2.52	2.3e-06
evgsoaploc10579t1	ZIP superfamily	2.51	8.3e-20
evgsoapTRINITY_DN63448_c0_g2_i1	Polysaccharide monooxygenase Cel61a	2.50	0.0006
evgsoapTRINITY_DN63483_c1_g3_i4	Uncharacterized protein	2.49	0.060
evgsoaploc10253t1	Uncharacterized protein	2.49	0.065
evgsoapTRINITY_DN58246_c1_g1_i5	oxidoreductase EphD	2.48	0.0002
evgsoapTRINITY_DN64236_c2_g5_i13	Cytochrome P450 4F5	2.475	0.00065
evgsoapTRINITY_GG_2_c1474_g1_i1	Uncharacterized protein	2.467	0.0004
evgsoapNODE_8214_length_1772_cov_23.9575_g4235_i1	Uncharacterized protein	2.46	0.078

evgsoaploc278283t1	Succinate dehydrogenase	2.45	0.0002
evgsoapNODE_34801_length_597_cov_111.614_g21577_i0	Uncharacterized protein	2.43	0.002
evgsoapTRINITY_DN56534_c0_g2_i1	Uncharacterized protein	2.41	0.0004
evgsoapTRINITY_DN58664_c0_g1_i2	Uncharacterized protein	2.41	1.2e-05
evgsoapNODE_52357_length_394_cov_107.811_g37647_i0	Uncharacterized protein	2.40	0.0802
evgsoapNODE_38691_length_536_cov_728.089_g24886_i0	Fatty-acyl-CoA synthase	2.39	0.050
evgsoaploc13101t1	4-O-methyltransferase 1	2.38	0.0183
evgsoapTRINITY_GG_5_c1526_g2_i1	Putative glutathione-dependent formaldehyde	2.37	1.34e-07
evgsoapTRINITY_DN62629_c1_g1_i1	Glycoside hydrolase family 61 protein	2.36	0.054
evgsoapTRINITY_GG_8_c2281_g1_i1	Flavin-containing monooxygenases (FMOs)	2.36	3.1e-05
evgsoapNODE_2621_length_2893_cov_43.0539_g1391_i0	protein HET-E-1	2.361	0.005
evgsoapNODE_1478_length_3544_cov_64.9834_g801_i0	Uncharacterized protein	2.36	0.0017
evgsoapNODE_1433_length_3576_cov_876.904_g773_i0	Alpha-xylosidase A	2.35	0.042

evgsoapNODE_17647_length_1071_cov_70.312_g9313_i0	Class III chitinase ARB_03514	2.355	0.0008
evgsoapTRINITY_GG_13_c1838_g1_i3	Glycoside hydrolase family 92 protein	2.34	0.0002
evgsoapNODE_76943_length_270_cov_2173_g62172_i0	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	2.32	0.034
evgsoapTRINITY_DN60733_c0_g1_i1	histidine phosphatase	2.327	9.27e-07
evgsoapNODE_12444_length_1373_cov_36.9469_g6436_i0	Protein kinase	2.32	0.0209
evgsoapTRINITY_GG_8_c2751_g1_i3	Uncharacterized protein	2.30	3.85e-09
evgsoapTRINITY_DN62036_c1_g1_i2	lipase	2.30	1.5e-06
evgsoapNODE_15263_length_1193_cov_70535.2_g4296_i2	Uncharacterized protein	2.29	4.83e-06
evgsoapNODE_3299_length_2670_cov_65.678_g1745_i0	protein HET-E-1	2.294	0.002
evgsoapTRINITY_GG_5_c1215_g1_i1	Cytochrome P450	2.29	5.94e-05

evgsoapTRINITY_DN62681_c0_g1_i9	Uncharacterized protein	2.27	0.0006
evgsoapNODE_45860_length_450_cov_83.2354_g31383_i0	Uncharacterized protein	2.27	0.083
evgsoapTRINITY_DN61177_c1_g1_i1	Uncharacterized protein	2.27	0.060
evgsoapTRINITY_DN21651_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	2.27	5.71e-12
evgsoapTRINITY_DN62382_c0_g1_i2	Isocitrate lyase	2.265	0.00063
evgsoapTRINITY_DN63678_c1_g1_i3	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	2.25	0.013
evgsoapTRINITY_DN61177_c1_g1_i3	Uncharacterized protein	2.23	0.00090
evgsoapTRINITY_DN58664_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	2.230	0.0014
evgsoapNODE_25818_length_790_cov_3224.96_g14651_i0	Uncharacterized protein	2.22	0.0016
evgsoapTRINITY_GG_13_c2241_g1_i1	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	2.220	0.040
evgsoapTRINITY_DN60310_c1_g1_i1	Cytochrome P450	2.20	2.6379e-09
evgsoapTRINITY_GG_5_c1406_g2_i2	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	2.207	0.002
evgsoapTRINITY_DN60332_c0_g1_i2	Prolyl aminopeptidase	2.2	2.1661e-05

evgsoapNODE_32503_length_640_cov_5370.74_g10843_i1	Uncharacterized protein	2.18	1.4071e-10
evgsoapTRINITY_GG_5_c1642_g1_i1	Uncharacterized protein	2.17	1.70579e-13
evgsoapNODE_1426_length_3586_cov_560.93_g769_i1	Carboxylic ester hydrolase	2.17	0.0798085
evgsoapTRINITY_DN61612_c0_g1_i1	Glycoside hydrolase family 30 protein	2.17	0.002
evgsoapNODE_11881_length_1414_cov_106.525_g6124_i0	cell surface protein	2.17	0.0001
evgsoapTRINITY_GG_7_c720_g1_i1	Uncharacterized protein	2.17	0.0048
evgsoapNODE_3412_length_2632_cov_92.1731_g1809_i0	F-box domain	2.16	1.5e-05
evgsoapTRINITY_DN60493_c0_g1_i2	Uncharacterized protein	2.15	3.5e-06
evgsoapTRINITY_DN58501_c0_g1_i1	Pre-mRNA splicing factor	2.13	6.5e-06
evgsoapTRINITY_GG_12_c1131_g2_i1	Uncharacterized protein	2.12	2.1e-05
evgsoapTRINITY_DN64330_c1_g1_i8	Stabilin-2	2.11	0.0001
evgsoapTRINITY_DN46901_c0_g1_i1	Hydrophobin SC3	2.098	0.0005

evgsoapNODE_19456_length_992_cov_412.815_g8460_i1	Cytochrome P450	2.08	1.06e-05
evgsoapNODE_20594_length_948_cov_439.831_g10295_i1	Cytochrome P450	2.07	0.0027
evgsoapTRINITY_DN58326_c0_g1_i1	Putative uncharacterized oxidoreductase	2.07	0.0004
evgsoapTRINITY_DN61823_c3_g1_i6	Heat shock protein 16	2.070	0.0490
evgsoapTRINITY_DN61132_c0_g1_i2	Transcription factor HIVEP3	2.05	1.09e-10
evgsoapNODE_25842_length_790_cov_106.766_g14668_i0	mannosyl-oligosaccharide alpha-1	2.047	0.021
evgsoapTRINITY_DN58307_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	2.0345	0.0280
evgsoapNODE_1525_length_3506_cov_53.0835_g826_i0	Vegetative incompatibility protein HET-E-1	2.03	4.24e-05
<u>evgsoapNODE_3958_length_2488_cov_1737.04_g2100_i0</u>	Uncharacterized protein	2.028	4.5e-11
<i>Dowregulated</i>			
evgsoapTRINITY_GG_8_c2158_g1_i1	GTP-binding protein rho1	-9.93	2.7e-27
evgsoapNODE_28256_length_730_cov_639.904_g16426_i0	Uncharacterized protein	-6.49	6.9e-05
<u>evgsoapNODE_5627_length_2140_cov_625.068_g2943_i0</u>	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	-4.81	6.53e-17

evgsoapTRINITY_GG_10_c1521_g1_i1	Growth arrest-specific protein 2 (GAS2)	-3.30	1.0e-09
evgsoapTRINITY_DN59618_c3_g2_i1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	-3.08	3.9e-05
evgsoapNODE_42229_length_489_cov_1675.78_g28031_i0	Uncharacterized protein	-2.84	0.001
evgsoapNODE_4471_length_2358_cov_1050.76_g2215_i1	Diacetyl reductase [(S)-acetoin forming]	-2.78	1.9e-10
evgsoapNODE_22483_length_886_cov_326.331_g12358_i0	Uncharacterized protein	-2.78	2.31e-06
evgsoapNODE_6426_length_2018_cov_443.434_g2206_i5	short-chain dehydrogenases/reductases family	-2.72	4.7e-05
evgsoapTRINITY_DN62511_c4_g1_i4	Lytic transglycosylase catalytic	-2.65	0.0001
evgsoapTRINITY_DN59202_c0_g1_i1	(R,R)-butanediol dehydrogenase	-2.64	2.2e-14
evgsoaploc26654t1	Uncharacterized protein	-2.63	4.2e-05
evgsoapTRINITY_DN62808_c0_g1_i1	cytochrome P450 monooxygenase af510	-2.59	1.9e-11
evgsoapTRINITY_DN64330_c1_g1_i2	Laminins	-2.56	2.0e-06
evgsoapTRINITY_DN62728_c0_g2_i3	ketoacyl-ACP synthase	-2.551	0.002
evgsoapTRINITY_GG_11_c2636_g1_i1	Uncharacterized protein	-2.53	6.5e-17
evgsoapTRINITY_DN64277_c0_g1_i7	Acylcarnitine hydrolase	-2.459	9.6e-07
evgsoapNODE_10683_length_1516_cov_665.949_g5502_i0	transglycosylase	-2.45	9.6e-06

evgsoapTRINITY_GG_7_c1478_g1_i1	5'3'-exonuclease	-2.43	1.2e-14
evgsoapTRINITY_GG_12_c1190_g1_i1	alcohol dehydrogenase	-2.385	1.8e-09
evgsoapTRINITY_DN47446_c0_g1_i1	Glycosyltransferase family 87	-2.37	0.0002
evgsoapNODE_22309_length_892_cov_297.366_g12245_i0	ABC transporter-like protein	-2.35	7.4e-06
evgsoapTRINITY_DN63519_c1_g1_i3	Alcohol oxidase 1	-2.33	4.33e-11
evgsoapTRINITY_DN58877_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	-2.33	3.4e-09
evgsoapNODE_35224_length_590_cov_199.617_g21923_i0	Uncharacterized protein	-2.318	0.0004
evgsoapNODE_5378_length_2181_cov_666.36_g1863_i3	Uncharacterized protein	-2.24	1.0e-09
evgsoapNODE_32262_length_645_cov_517.481_g19514_i0	Adenine deaminase	-2.23	1.80e-05
evgsoapTRINITY_DN62821_c4_g4_i2	Aminotransferase	-2.22	0.004
evgsoapTRINITY_DN59794_c0_g1_i1	Uncharacterized protein	-2.17	0.0002
evgsoaploc281849t1	acyl-CoA N-acyltransferase	-2.16	0.074

evgsoapNODE_12191_length_1391_cov_71.8937_g6290_i0	AB hydrolase superfamily protein YdjP	-2.15	5.9e-05
evgsoapTRINITY_DN63448_c0_g2_i4	Glycoside hydrolase family 61 protein	-2.153	0.019
evgsoapNODE_1119_length_3846_cov_65.2706_g606_i1	Bifunctional solanapyrone synthase	-2.15	0.001
evgsoapNODE_14071_length_1265_cov_556.575_g7320_i0	RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey	-2.136	0.0022
evgsoapNODE_37070_length_560_cov_104.242_g23487_i0	heat shock protein	-2.12	0.0002
evgsoapTRINITY_DN57749_c0_g1_i2	DNA excision repair protein ERCC-1	-2.10	0.0143
evgsoapNODE_16993_length_1103_cov_176.797_g8938_i0	Glutamine amidotransferase (GATase)	-2.10	0.002
evgsoapNODE_4968_length_2260_cov_26.317_g2603_i0	Uncharacterized protein	-2.066	0.004
evgsoapTRINITY_DN60486_c3_g1_i1	Glycosyl transferase	-2.06	0.0325
evgsoapNODE_48357_length_426_cov_1819.99_g33759_i0	Uncharacterized protein	-2.06	0.0325
evgsoapTRINITY_GG_12_c944_g1_i1	Farnesyl pyrophosphate synthase	-2.062	7.3e-05
evgsoapTRINITY_DN60220_c1_g1_i1	Amino-acid permease inda1	-2.062	2.5e-12
evgsoapTRINITY_GG_12_c1193_g1_i2	N-glycosidase R617	-2.04	2.5e-07

evgsoapNODE_20113_length_966_cov_54.9232_g10857_i0	Uncharacterized protein	-2.03	0.001
evgsoapTRINITY_DN62479_c0_g1_i5	Uncharacterized protein	-2.014	0.053
<u>evgsoapNODE_49870_length_413_cov_511.855_g35197_i0</u>	<u>Uncharacterized protein</u>	<u>-2.006</u>	<u>4.5e-06</u>

Somente um DEG, identificado como *tms1*, foi comum nos três pontos avaliados, esse o gene codifica para *Thymidylate synthase* (TS). Sete DEGs foram compartilhados entre 3DAI e 7DAI, dentro os quais, dois codificam para diferentes proteínas hidrofobinas e estão superexpressos em ambos os dias. Sete também foi o número de DEGs em comum nos dias 3 e 11. Apenas dois desses genes mativeram o padrão comportamental e continuaram regulados negativamente durante todo o período avaliado, esses genes codificam para proteínas ainda não caracterizadas. Genes que codificam para metabólitos secundários em 3DAI estão reprimidos, no entanto em 7DAI a expressão torna-se positiva (Figura 21). Tais informações ressaltam as diferentes respostas moleculares e biológicas do fungo em decorrência do tempo de cultivo ou em função do composto tóxico.

Nos dias 7 e 11 dias o número de DEGs em comum foi maior (33), e todos apresentaram o mesmo padrão, ou seja, o gene permaneceu *upregulated* ou *downregulated*. Apenas três desses genes foram reprimidos ou menos expressos no bioensaio T. Esses genes são identificados como: METBIDRAFT_42631, *bdhA* e *AOX1*, dos quais os dois últimos DEGs codificam para duas *oxirredutases butanediol dehydrogenase* e *Methanol oxidase 1*, respectivamente (Figura 21).

Genes que codificam para proteínas envolvidas na degradação de compostos tóxicos como esterase e metaloprotease estão reguladas positivamente em 7DAI e 11DAI. Assim como genes que codificam para hidrolases envolvidas no metabolismo de carboidrato e lipídeo. Como discutido no capítulo II, a degradação dos ésteres de forbol foi mais acentuada entre os dias 7 e 12 de cultivo.

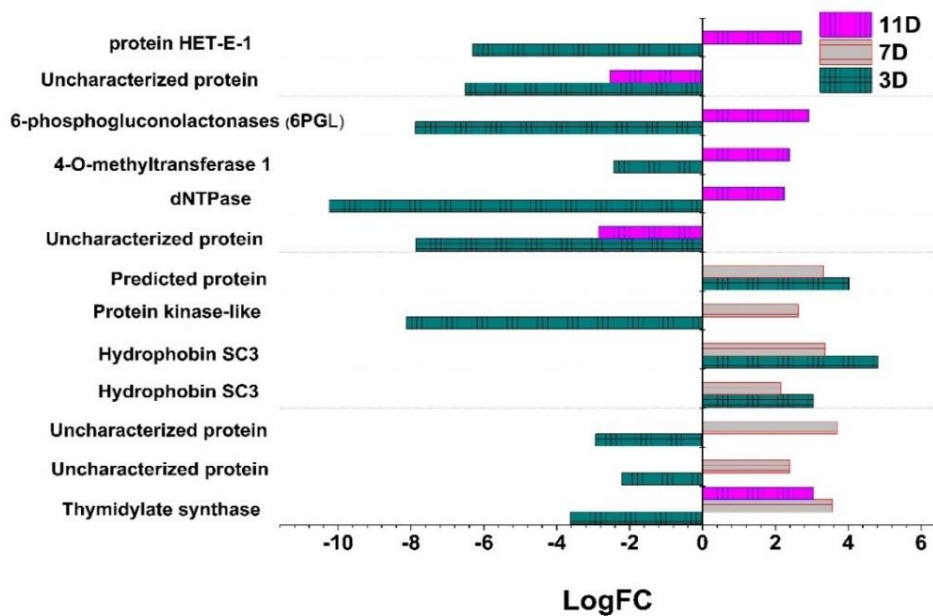


Figura 20. Genes em comum que estão diferencialmente expressos pelo basidiomiceto *P. pulmonarius* EF88 nos três momento analisados (3DAI, 7DAI e 11DAI).

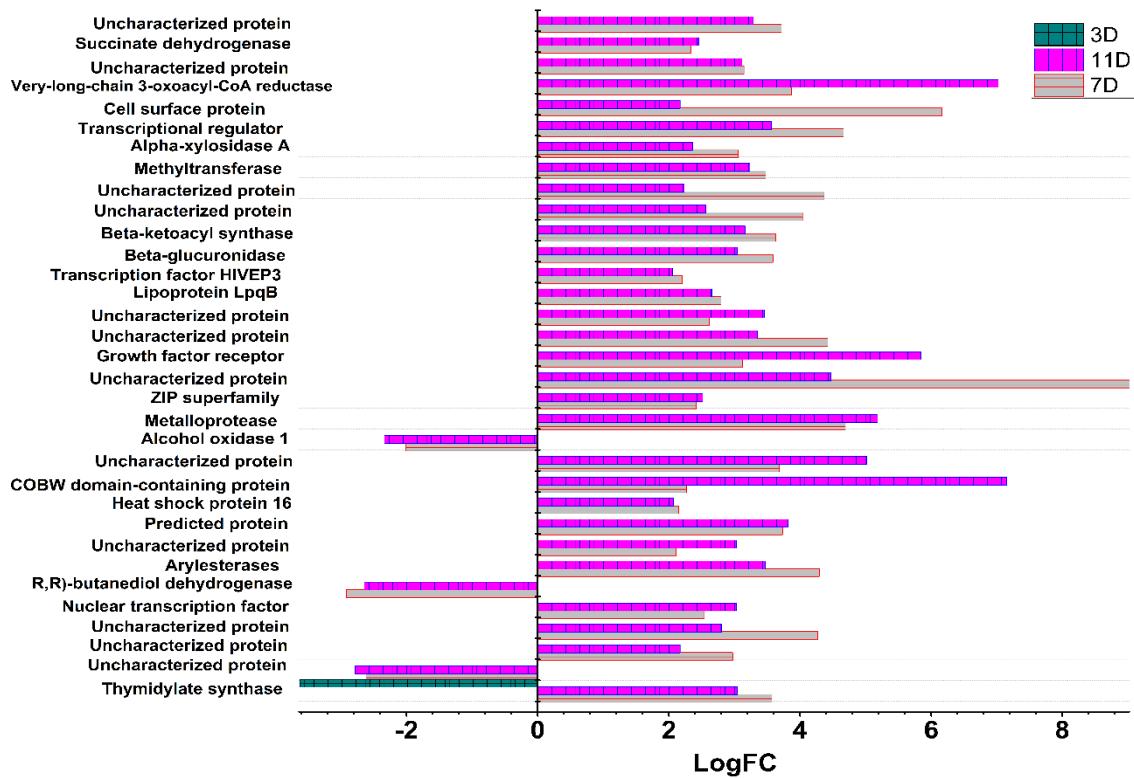


Figura 20. Genes em comum que estão diferencialmente expressos pelo basidiomiceto *P. pulmonarius* em 7 e 11DAI.

Genes que codificam para proteínas hidrofobinas e para monooxigenases do citocromo 450 estão expressas em todos os tempos de cultivo analisados 3, 7 e 11DAI (tabela 10). Proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeo e carboidratos estão expressas positivamente em 7 e 11 DAI, tempos de cultivo onde a resposta de degradação dos ésteres de forbol se intensifica. Genes candidatos a degradação dos ésteres de forbol estão apresentados na tabela 10 e 11, a seguir, e serão discutidos posteriormente.

Tabela 10. DEGs candidatos a degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* EF88 expressos em todos os tempos de cultivo analisados.

Gene	LogFC	Proteína
3 DAI		
G3Y416	4.03	Monooxigenase P450
HYD-1	4.82	Hidrofobina
POH2	3.03	Hidrofobina
7DAI		
WOLCODRAFT_167027	3.09	Monooxigenase P450
HYD-1	3.36	Hidrofobina
POH2	2.14	Hidrofobina
11DAI		
patl	2.84	Monooxigenase P450
af510	2.72	Monooxigenase P450
Cyp4f5	2.47	Monooxigenase P450
ppoA_3	2.20	Monooxigenase P450
KUTG_07618	2.08	Monooxigenase P450
ppoA	2.07	Monooxigenase P450
Hydph7	3.57	Hidrofobina
Hydph8	2.09	Hidrofobina

Tabela 11. DEGs candidatos a degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius* EF88 expressos em 7DAI e 11DAI.

Gene	7DAI LogFC	11DAI LogFC	Proteína
DFR76_10551	2.79	2.65	acetoacetyl-CoA thiolase
sdhaf1A	2.33	2.45	Succinate dehydrogenase
PLEOSDRAFT_50927	3.87	7.02	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase
CHU_2040	3.63	3.16	Esterase
axlA	3.05	2.35	Alpha-xylosidase
NCU00937	3.58	3.03	β -glucuronidase
SMAC_06893	4.69	5.18	Metalloprotease
PLEOSDRAFT_1083952	4.29	3.47	flavin reductase

4.2 Validação genes candidatos a degradação de ésteres de forbol

Baseados nos resultados de expressão gênica diferencial obtidos *in silico*, foram selecionados um total de 21 genes do EF88 candidatos a degradação dos ésteres de forbol presentes na torta de pinhão-manso (tabela 9 e 10). Todos os 21 genes candidatos foram validados quanto sua expressão via RT-qPCR e a análise de expressão gênica foi dada pela diferença entre as médias da expressão relativa entre os tratamentos T e NT.

Dados *in silico* de expressão diferencial gênica indicou que quatro diferentes genes (*HYD-1*, *POH2*, *Hydph7*, *Hydph8*) codificadores de proteínas hidrofobinas, foram diferencialmente expressos em todos os dias de cultivo avaliados. Sendo assim, esses genes foram selecionados como potenciais candidatos a degradação dos ésteres de forbol.

Como possível observar na figura 22 o gene *HYD-1* estava regulado positivamente em 3DAI e 7DAI, com expressão relativa de 0,75 e 0,48, respectivamente. No entanto em 11DAI a expressão gênica se altera, e o gene passa a estar regulado negativamente (-0,1095) no tratamento T. O Gene *POH2* está superexpresso em todos os dias analisados. A expressão foi maior em 3 e 7 DAI com expressão relativa de 0,87 e 0,83, respectivamente. Em 11DAI a expressão continua positiva, no entanto, diminuí para 0,36. Dentre os quatros diferentes genes que codificam para hidrofobinas, a menor expressão foi do gene *Hydph7*, que em 3DAI estava regulado negativamente com expressão relativa de -2,2. Em 7DAI e 11DAI a expressão passa a ser positiva, com maior expressão em 11DAI. Já o gene *Hydph8* estava expresso positivamente em todos os dias. Em 3 DAI a expressão relativa foi de 0,65, em 7DAI a expressão aumenta para 3,2 e no último dia analisado (11DAI) a expressão foi de 0,6 (Figura 22).

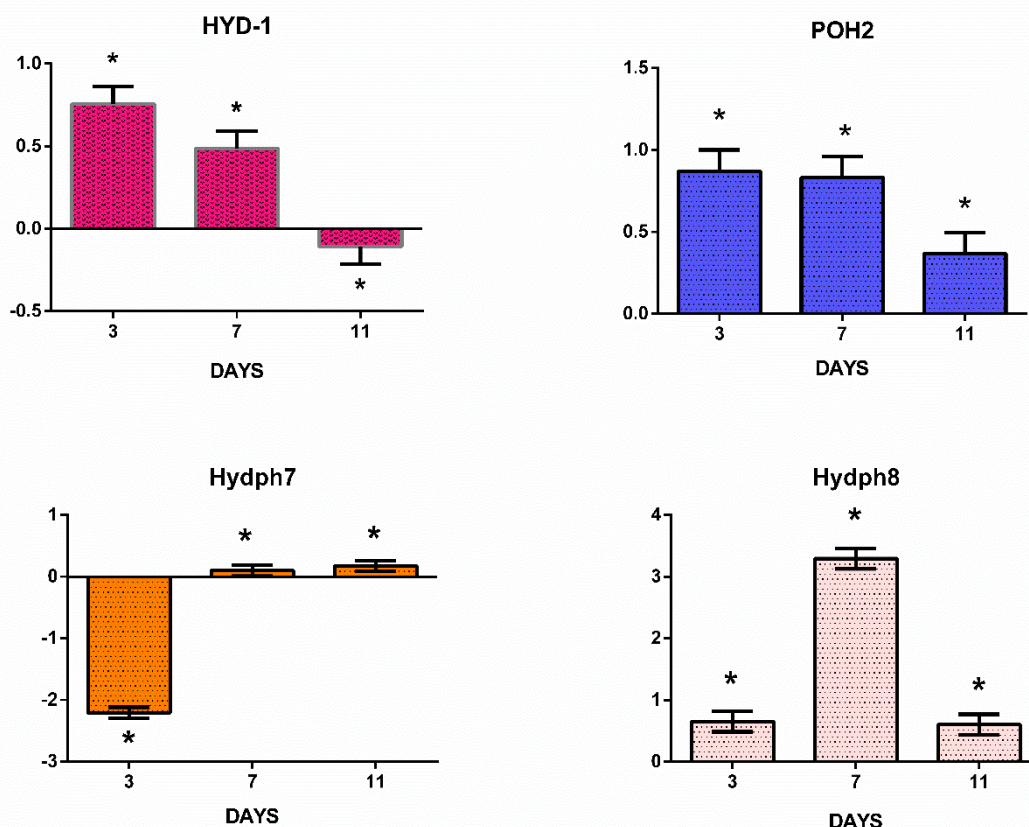


Figura 22. Níveis de expressão relativa dada pela razão entre os tratamentos T e NT dos genes que codificam para hidrofobinas, que são proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico.

As monooxigenases do citocromo P450 também são enzimas candidatas a degradação dos ésteres de forbol, como indicado nos resultados *in silico*. Diferentes genes que codificam para essas enzimas estão positivamente expressas em todos os momentos analisados. Dessa forma, os genes *G3Y416*, *Q4WAZ6*, *WOLCODRAFT_167027*, *pat1*, *af510*, *Cyp4f5*, *ppoA_3*, *ppoA*, *KUTG_07618* que codificam para monooxigenases do citocromo P450 foram validadas quanto sua expressão relativa via RT-qPCR.

Dos 9 genes que codificam para essa classe de enzima, apenas os genes *Q4WAZ6* e *KUTG_07618* mostraram uma expressão gênica diferente dos demais (Figura 23). O gene *Q4WAZ6* apesar da expressão positiva em todos os momentos 3-7-11 DAI, apresentou uma diminuição na expressão em 7DAI, como observado na figura 23. O gene *KUTG_07618* foi o menos expresso quando comparado aos demais, em 3DAI sua expressão estava reprimida ou

menos expressa em relação ao tratamento controle NT (-0,6). Em 7 e 11 DAI a expressão passa a ser positiva, com valores relativos de 0,35 e 0,06, respectivamente. O perfil de expressão relativa dos genes *G3Y416*, *WOLCODRAFT_167027*, *patI*, *af510*, *Cyp4f5*, *ppoA_3*, e *ppoA* foi semelhante: aumento da expressão nos primeiros dias (3-7DAI) e em 11DAI a expressão diminuí ou está reprimida em relação ao tratamento atóxico-NT.

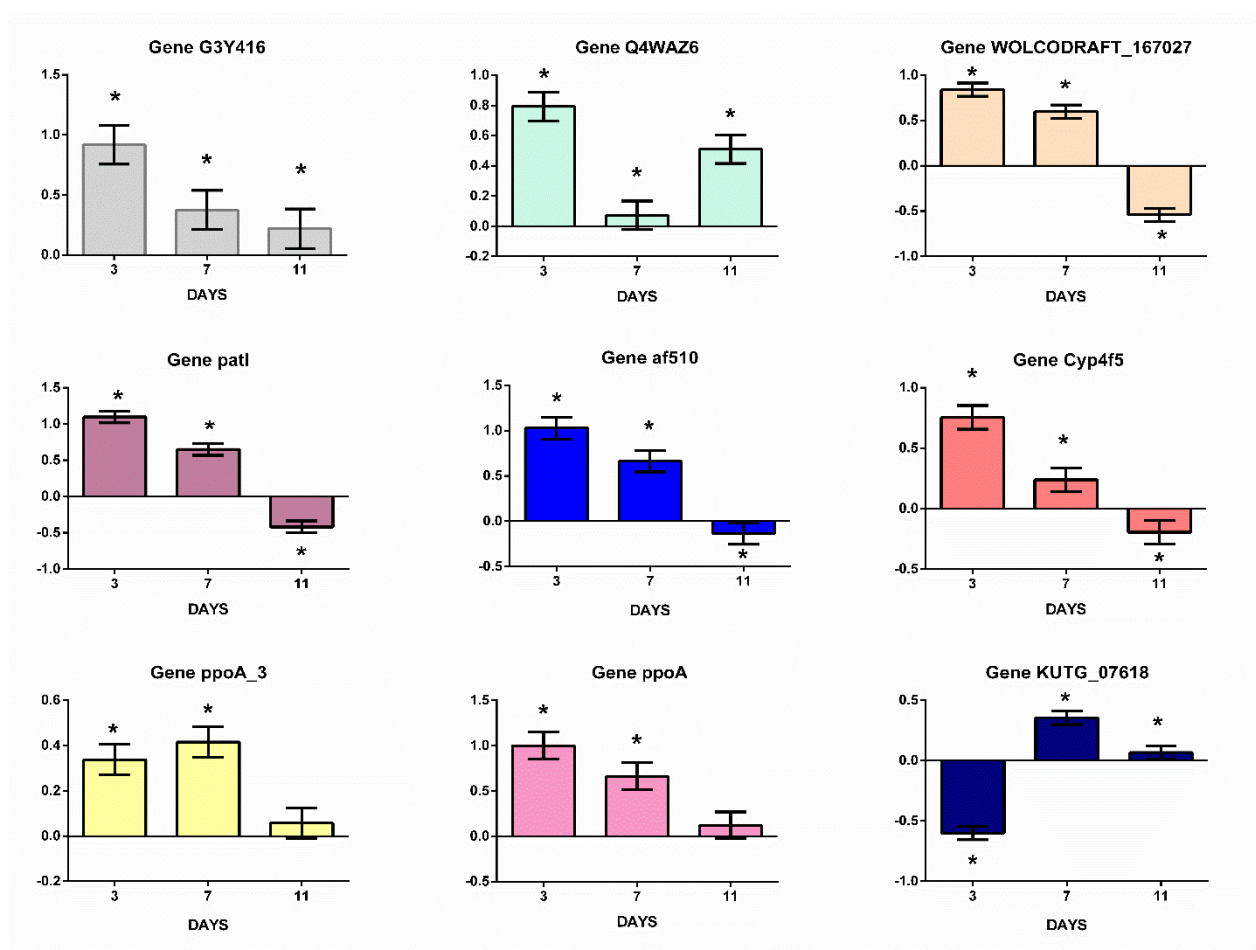


Figura 23. Níveis de expressão relativa dada pela razão entre os tratamentos T e NT dos genes de EF88 que codificam monooxigenases do citocromo P450, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico.

Os resultados *in silico* também indicaram que genes que codificam para enzimas envolvidas em outros processos de degradação de xenobióticos estavam diferencialmente expressos. Como por exemplo, os genes

DFR76_10551, *SMAC_06893* e *CHU_2040* que codificam para uma *thiolase*, *metalloprotease* e *esterase*, respectivamente.

Os resultados de expressão gênica por RT-qPCR mostrou que o gene *DFR76_10551* estava superexpresso na torta tóxica em todos os dias analisados. A maior expressão foi em 3 DAI, onde a expressão relativa foi de 1,05, em 7DAI a expressão diminuí para 0,64 e em 11DAI a expressão foi de 0,01. A expressão do gene *SMAC_06893* foi positiva na torta tóxica em todos os momentos, com expressão relativa de 0,91; 0,67 e 1,02. O gene *CHU_2040* que codifica para uma esterase apresentou expressão positiva nos primeiros dias analisados (3 e 7) com maior expressão em 7DAI. Não houve diferença significativa nos valores de expressão dos tratamentos em 11DAI (figura 24).

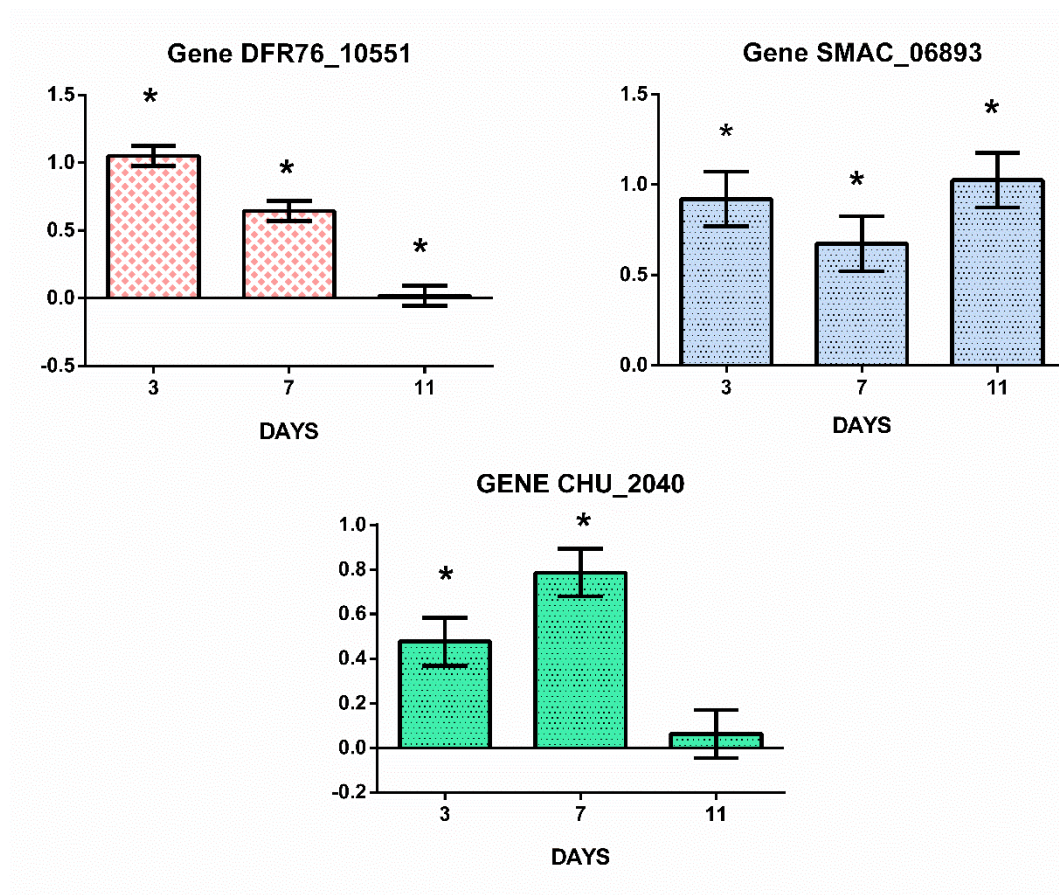


Figura 24. Níveis de expressão relativa dos genes de EF88 que codificam para thiolase, metalloprotease e esterase, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico.

Os resultados *in silico* mostraram que os genes *sdhaf1A*, *PLEOSDRAFT_50927*, *PLEOSDRAFT_1083952* que codificam respectivamente para *Succinate dehydrogenase*, *Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase*, *flavin reductase* estavam positivamente expressos no tratamento tóxico. No entanto, nos dados de expressão relativa via RT-qPCR os três genes apresentaram comportamento diferente dos dados de expressão diferencial *in silico*, como apresentado na figura 25, os genes estavam negativamente expressos no substrato tóxico.

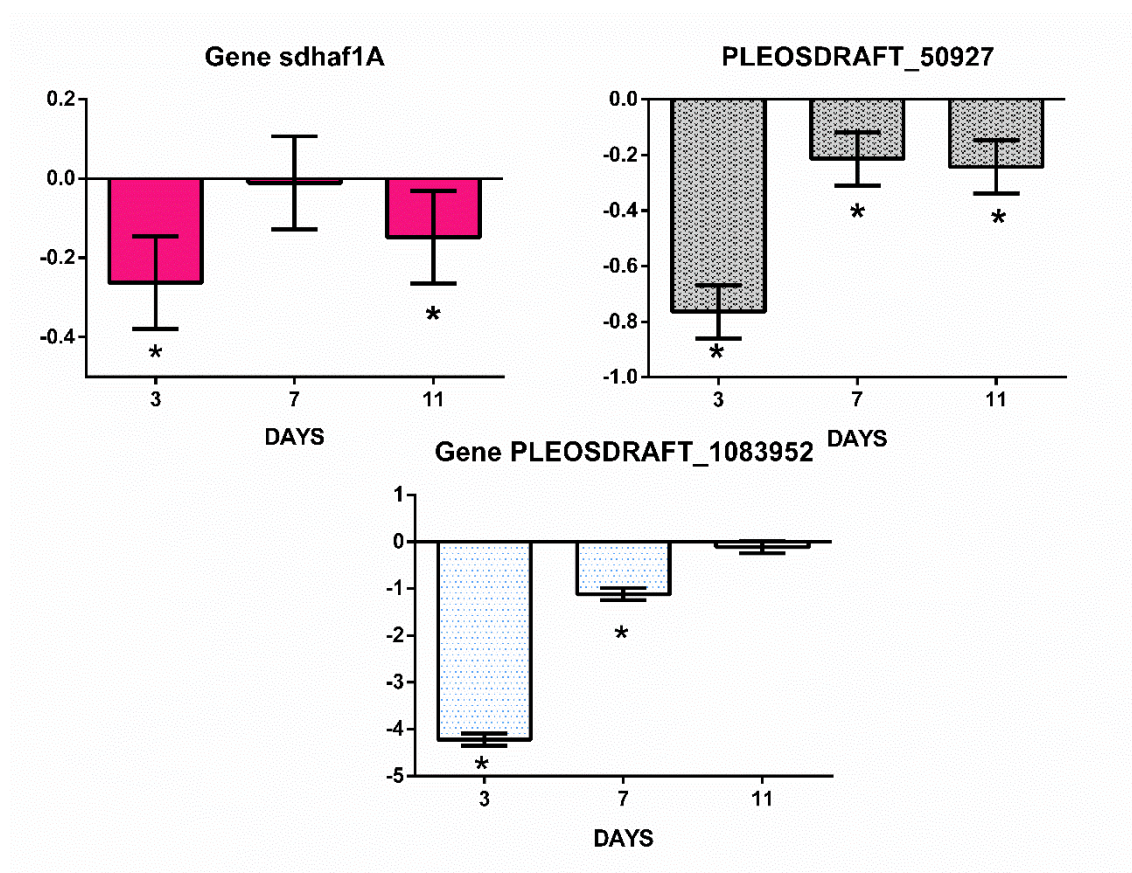


Figura 25. Níveis de expressão relativa dos genes que codificam para *Succinate dehydrogenase*, *Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase*, *flavin reductase*, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico.

De acordo com os dados *in silico*, dois genes envolvidos no metabolismo de carboidratos foram diferencialmente expressos na torta tóxica. No entanto, de acordo com os dados de expressão relativa via RT-qPCR, o gene *axIA* que codifica para uma *alpha-xylosidase*, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos em 3 e 7 DAI. Em 11 DAI, a expressão relativa em torta tóxica foi negativa. O gene *NCU00937* que codifica para uma β -glucuronidase apresentou expressão relativa positiva em todos os momentos em torta tóxica nos dados de RT-qPCR (figura 26).

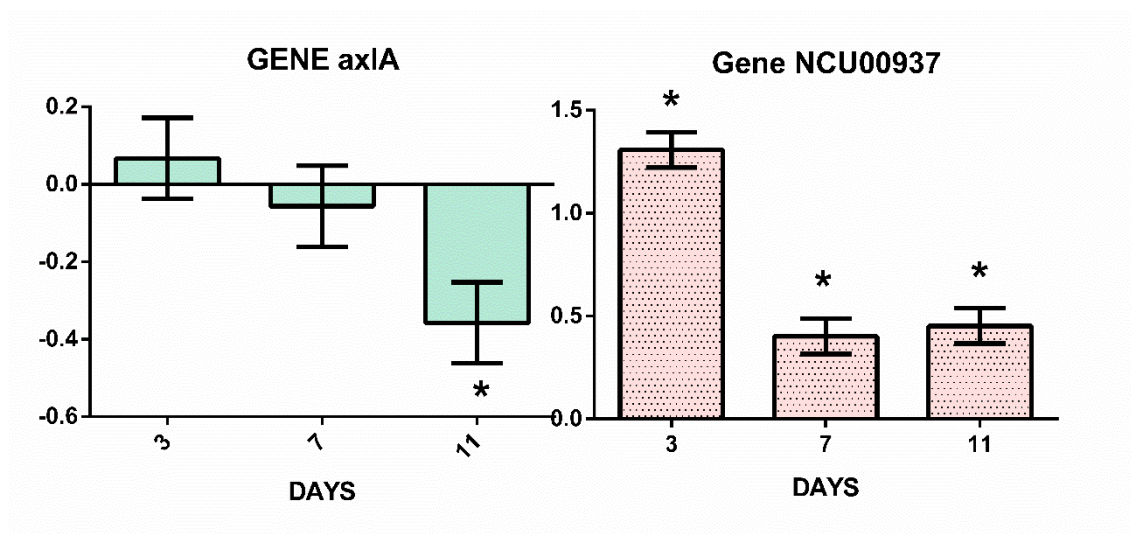


Figura 26. Níveis de expressão relativa dos genes de EF88 que codificam para *alpha-xylosidase* e β -glucuronidase, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento tóxico e não tóxico.

4.3 Secretoma global e análise proteômica do *P. pulmonarius*

Foram identificadas 106 proteínas reguladas entre os tratamentos tóxicos-T e não tóxico-NT em 9 dias de cultivo, sendo apenas uma delas identificada no banco do vegetal, que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições. Como critério adicional de estringência, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídios, limitando o total de proteínas reguladas a 23, nenhuma das quais pertencente a *Jatropha curcas* (pinhão-manso). Em 12 DAI foram identificadas 119 proteínas reguladas entre as condições analisadas, sendo apenas duas delas identificadas no banco de pinhão-manso, que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre condições. As proteínas reguladas foram agrupadas em *clusters* de acordo com seus perfis de abundância. Como critério adicional de estringência, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídios, limitando o total de proteínas reguladas a 40, ainda contendo as duas proteínas vegetais, as quais foram excluídas a partir das análises de agrupamento de proteínas, vias metabólicas e ontologia gênica

Dessa forma foi realizada uma segunda etapa de análise estatística utilizando-se a plataforma *MetaboAnalyst* (Chong et al., 2018). Foi incrementada a análise multivariada de forma a se obterem os *Variable Importance Projection scores (VIP-scores)*, indicando as proteínas que melhor discriminam entre as condições e *partial least squares discriminant analysis-PLS-DA* como forma de aprimorar, em relação à análise de PCA, a detecção de grupos de proteínas diferencialmente abundantes (Le Cao et al., 2011), mostrado na figura 28. Foram também gerados gráficos de correlações entre as todas proteínas reguladas (figura 29). Após as correções estatísticas, foi gerado novo mapa de correlação entre condições por perfis de abundância para as 23 principais proteínas em 9DAI e 40 principais proteínas em 12DAI, apontadas pela nova análise (30).

A análise de PLS-DA mostrados na figura 28 dos grupos de proteínas diferencialmente abundantes nos tratamentos T e NT, confirmam a hipótese que *P. pulmonarius EF88* apresenta resposta metabólica diferente quando cultivado em torta de pinhão-manso com presença e ausência de éster de

forbol. Os resultados de correlações entre o conjunto completo de proteínas analisadas mostrando a razão entre as abundâncias relativas normalizadas de cada proteína regulada, 23 em 9DAI e 40 em 12DAI, estão ilustrados na figura 28. Tons de vermelho indicam correlação positiva, tons de azul, correlação negativa.

As proteínas que melhor discriminam entre as condições, em 9DAI e 12 DAI estão apresentados na figura 30. Dentre as proteínas que mais se discriminam nos tratamentos T e NT em 9DAI, destacam-se A0A067T9i9, A0A067NYT5, A0A067NRL6, A0A067NZ51, identificadas como metalloproteinase, *heat shock protein*, *Cytochrome b5* e hidrolase de éster carboxílico, respectivamente. Já em 12DAI dentre as proteínas que melhor discriminam entre os tratamentos A0A067NTA0, A0A067NEB2, A0A067P2R6, A0A067P227, A0A067NLX2, A0A067NYG5, A0A067NHH3 identificadas como metalloprotease, keto reductase, aminoendopeptidase, Glutamine amidotransferase, *Cytochrome b5*, Polysaccharide lyase e Aldehyde dehydrogenases, respectivamente.

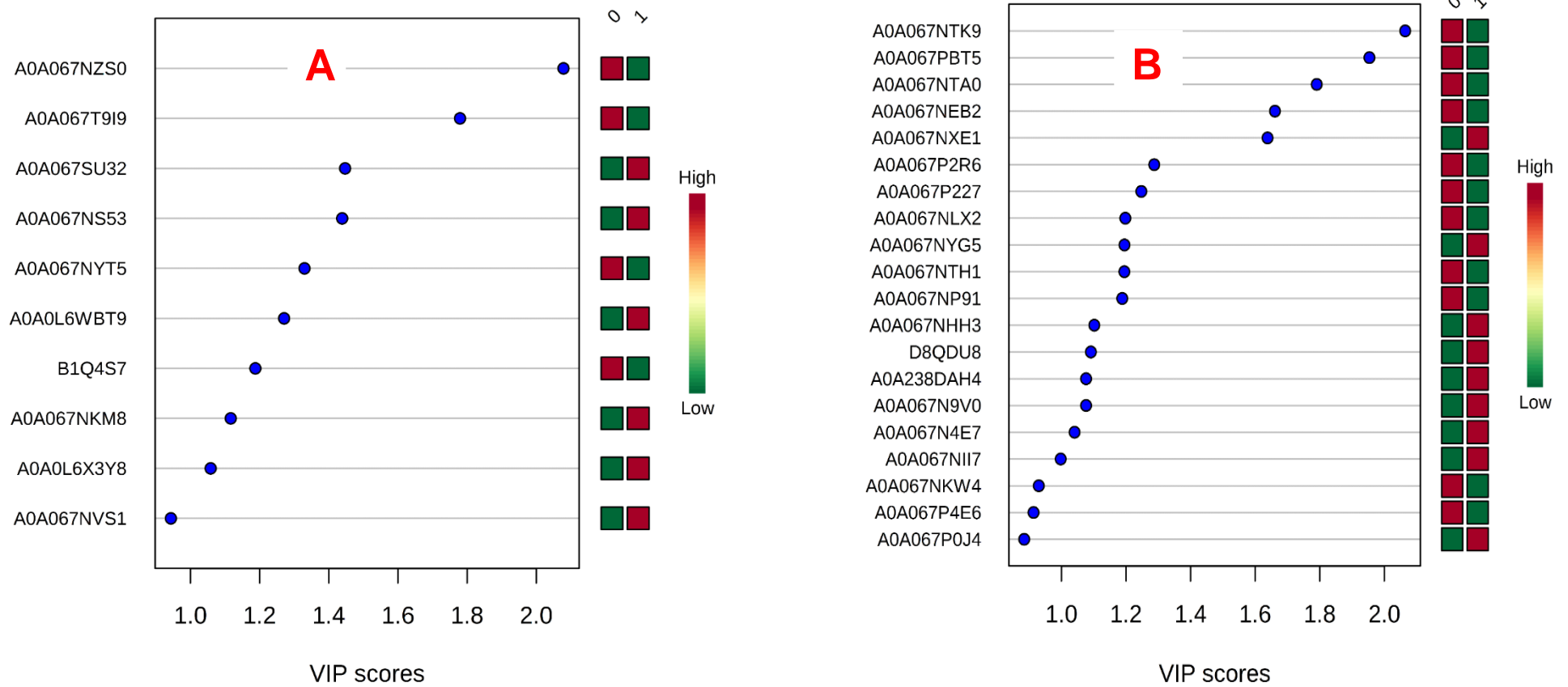


Figura 27. VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições. 0=T; 1=NT. A- 9DAI; B-12DAI.

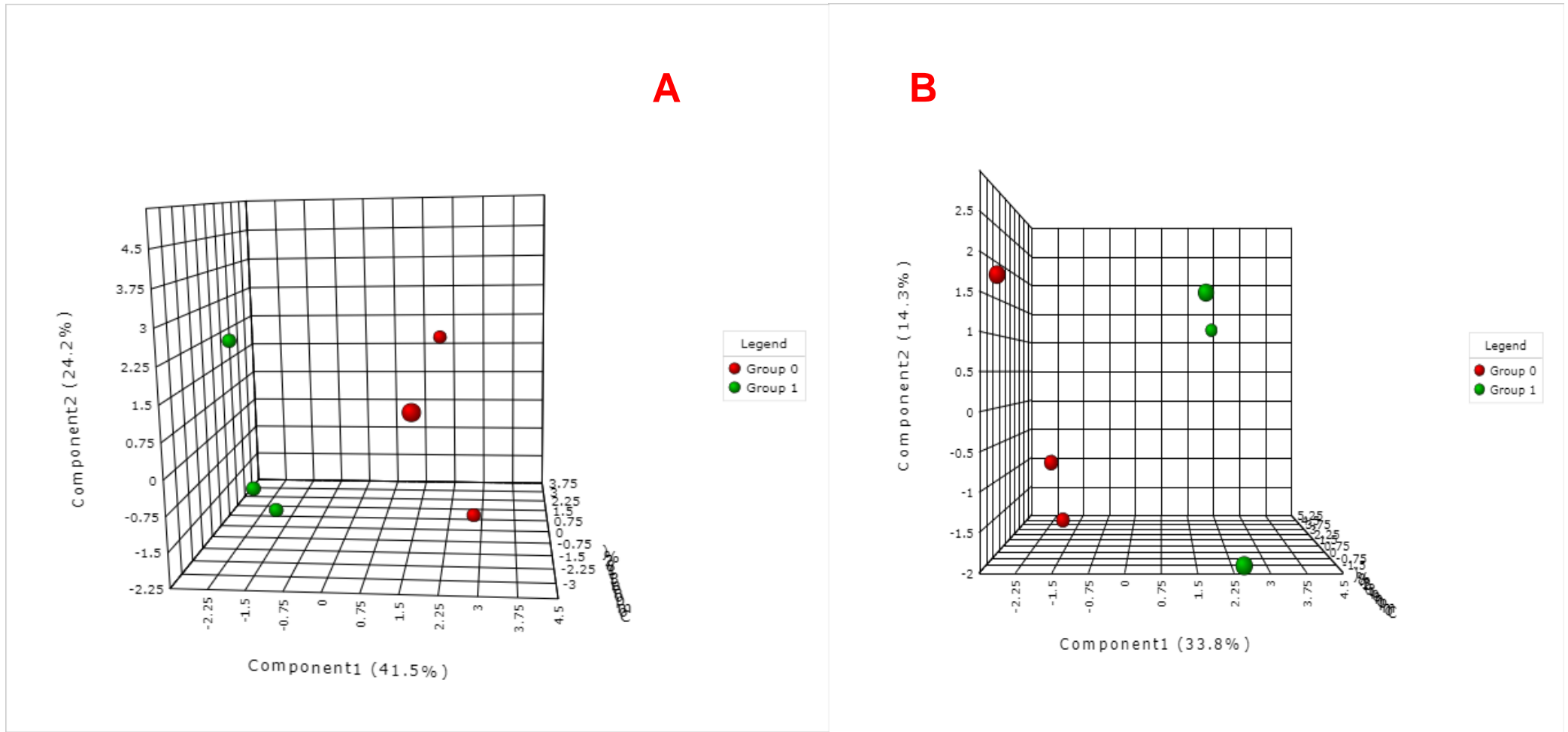


Figura 28. PLS-DA 3D mostrando o agrupamento de replicatas e diferenciação entre as condições. Na legenda da imagem, os grupos 0 e 1 correspondem a T e NT.A-9 DAI; B-12 DAI.

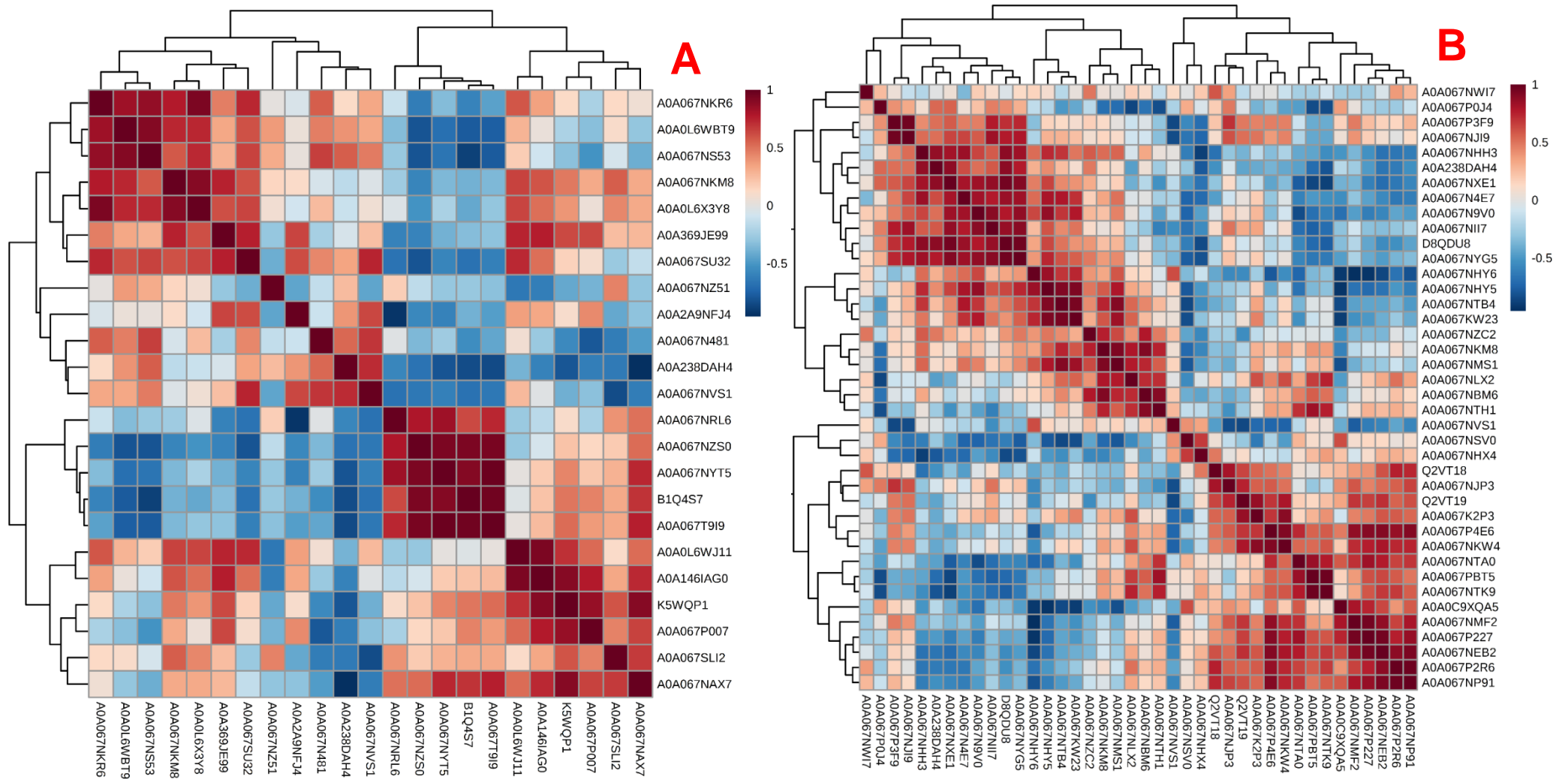


Figura 29. Mapa de correlações entre o conjunto completo de proteínas analisadas mostrando a razão entre as abundâncias relativas normalizadas de cada proteína regulada. Tons de vermelho indicam correlação positiva, tons de azul, correlação negativa. A-9 DAI; B-12DAI

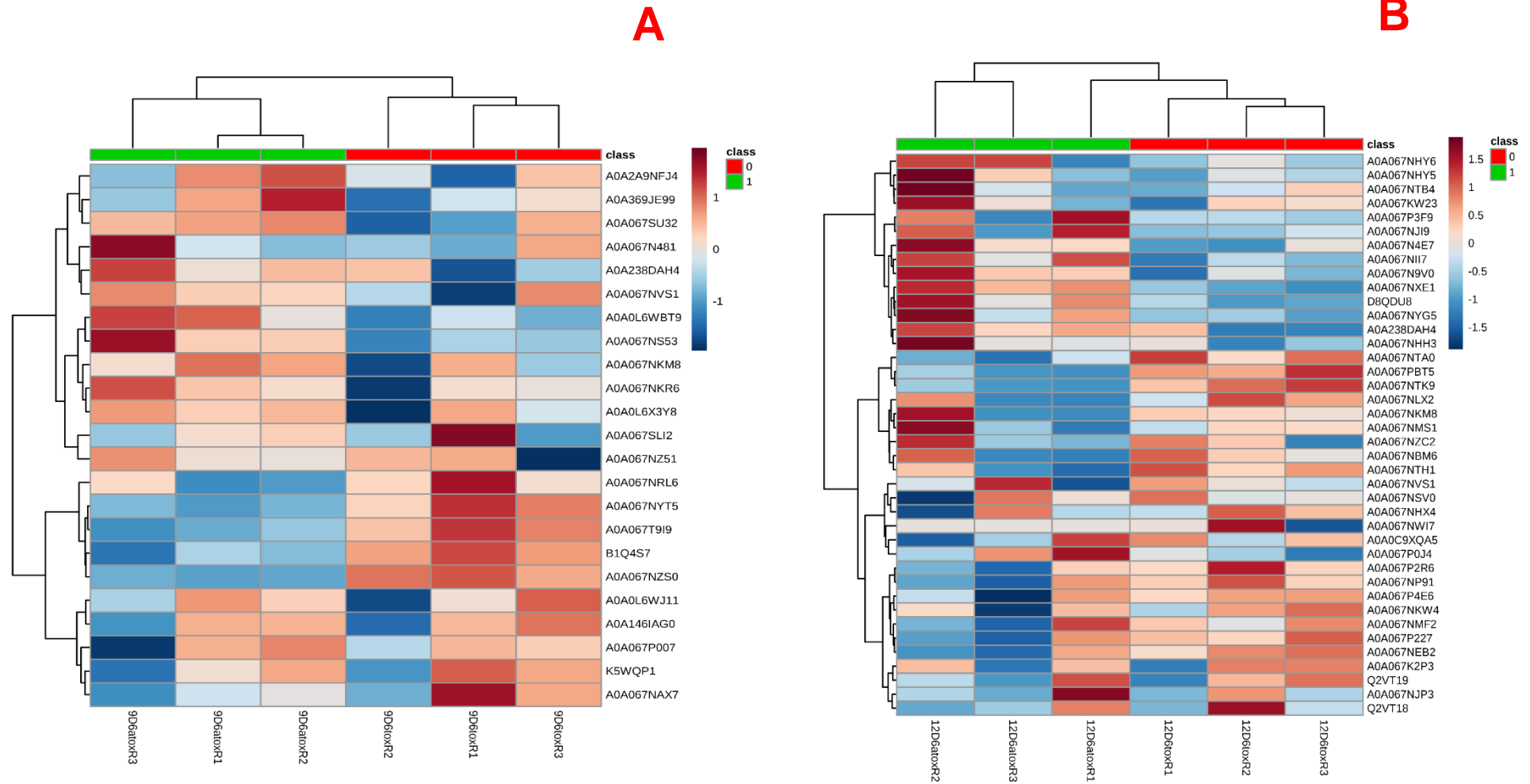


Figura 30. Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições após a segunda etapa de análises estatísticas. O conjunto completo das proteínas reguladas atendeu ao fator limitante do agrupamento das replicatas em cada condição. A- 9 DAI; B-12 DAI.

4.4 Gene Ontology e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

As categorias funcionais de *Gene Ontology* (GO) e vias de Kegg (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), foram geradas para as proteínas reguladas nos tratamentos avaliados, tóxico (T) e não tóxico (NT). Para permitir uma análise adequada de representação de vias e termos GO, foi realizado um mapeamento dos códigos de acesso das proteínas para códigos de genes nos bancos pertinentes aos programas de predição. Para isso, foi utilizada as plataformas de mapeamento *BLASTKoala* para identificar as vias de Kegg e *Blast2GO* para gerar os termos de GO. A plataforma Revigo revelou agrupamentos semânticos entre os termos GO mais frequentes associados às proteínas reguladas.

Sobre as análises de Kegg, duas vias distintas contendo proteínas reguladas foram detectadas por *BLASTKoala*. Em 9DAI foram atribuídos 12 anotações para a categoria de função molecular, relacionados principalmente a *hydrolase activity*. Em relação a categoria de processos biológicos foram identificados 9 anotações, ao qual a maior parte está relacionada a *organic substance metabolic process* e *primary metabolic process*. Em relação a categoria de componente celular foram atribuídas 10 anotações, envolvidos principalmente em processos intracelulares.

Em 12DAI foram identificadas 9 anotação para função molecular, e assim como em 9DAI a maior parte também está relacionada a *hydrolase activity*. Os GO relacionados a categoria de processos biológicos em 12DAI se assemelharam aos resultados encontrados em 9DAI. Já em relação a categoria de componente celular foram atribuídas 11 anotações também relacionados, em sua maioria, a processos intracelulares.

No que se refere aos agrupamentos semânticos de função molecular mais frequentes em 9DAI e 12DAI, destacam-se atividade catalítica, de hidrolase, de metaloproteinase, *peroxiredoxin*, ligação de celulose e carboidrato. Entre os termos mais frequentes agrupados na categoria de processos biológicos, as funções que mais se destacam estão relacionadas a *cellular oxidant detoxification response to reactive oxygen species*, *oxydation-reduction process* e *cell redox homeostasis*.

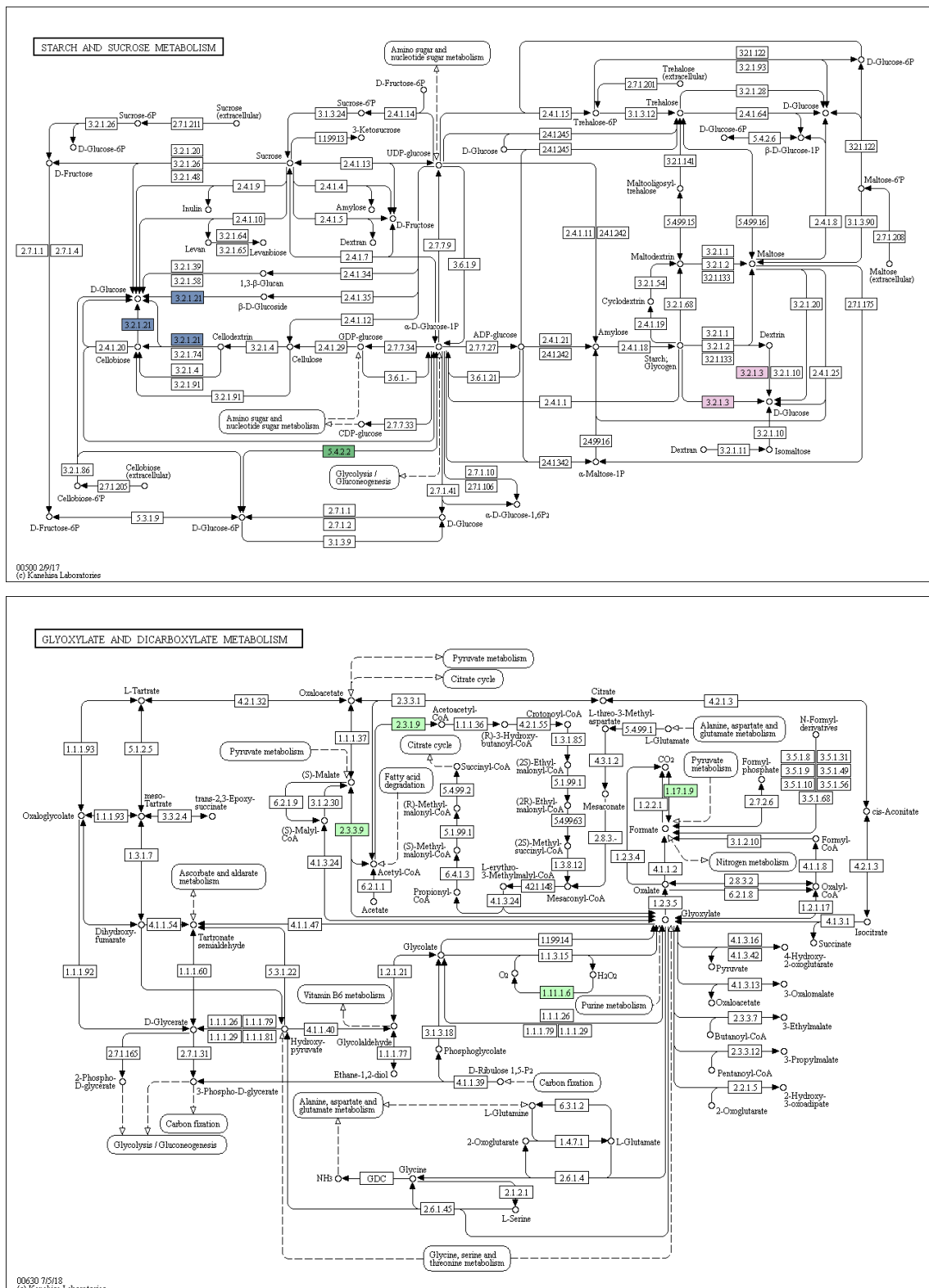
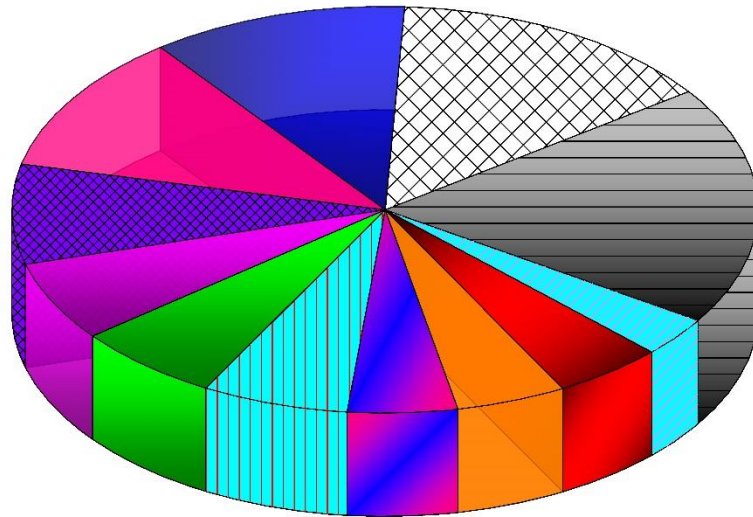














Figura 21. Agrupamento das proteínas em vias. Duas vias contendo proteínas reguladas detectadas por *BlastKoala*.

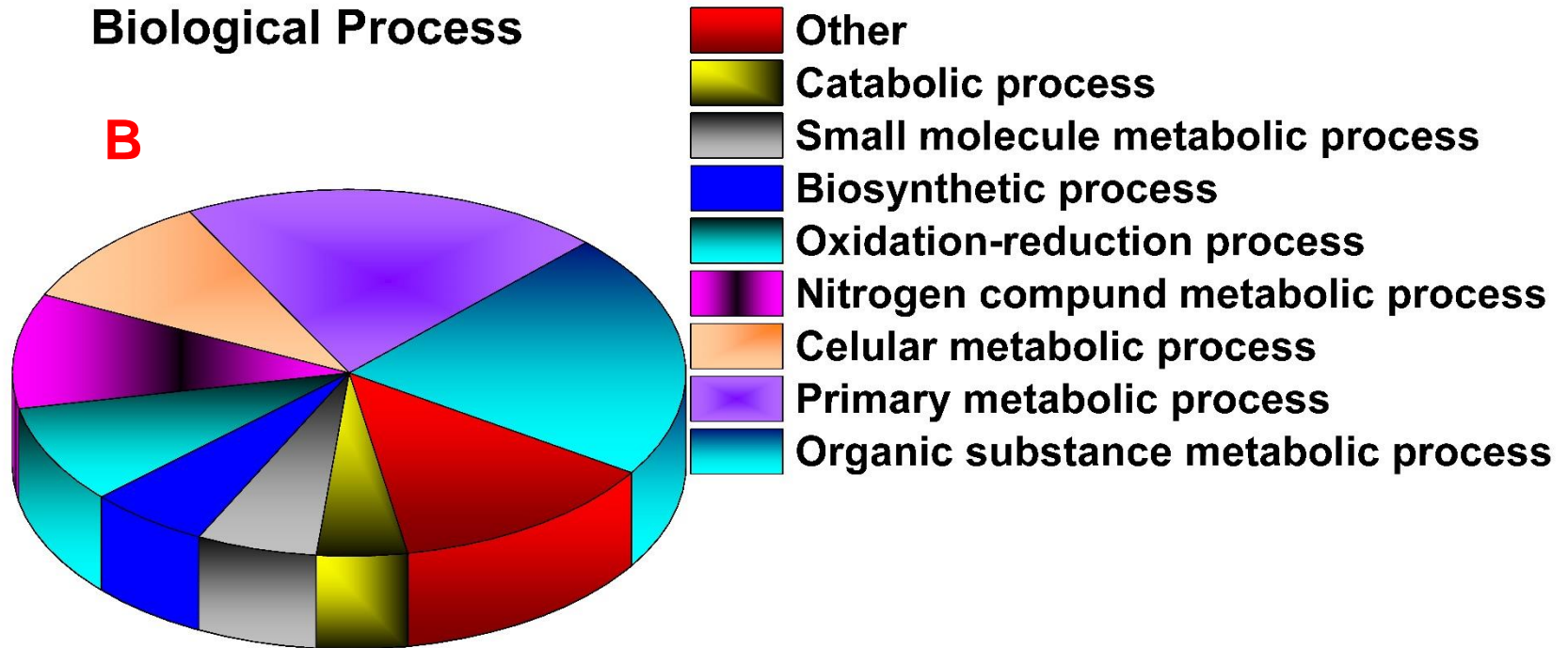
Molecular function

A

-  Lyase activity
-  Catalytic activity, acting on a protein
-  Cofactor binding
-  Carbohydrate binding
-  Carbohydrate derivative binding
-  Drug binding
-  Small molecule binding
-  Oxidoreductase activity
-  Heterocyclic compound binding
-  Organic cyclic compound binding
-  Ion binding
-  Hydrolase activity

Biological Process

B



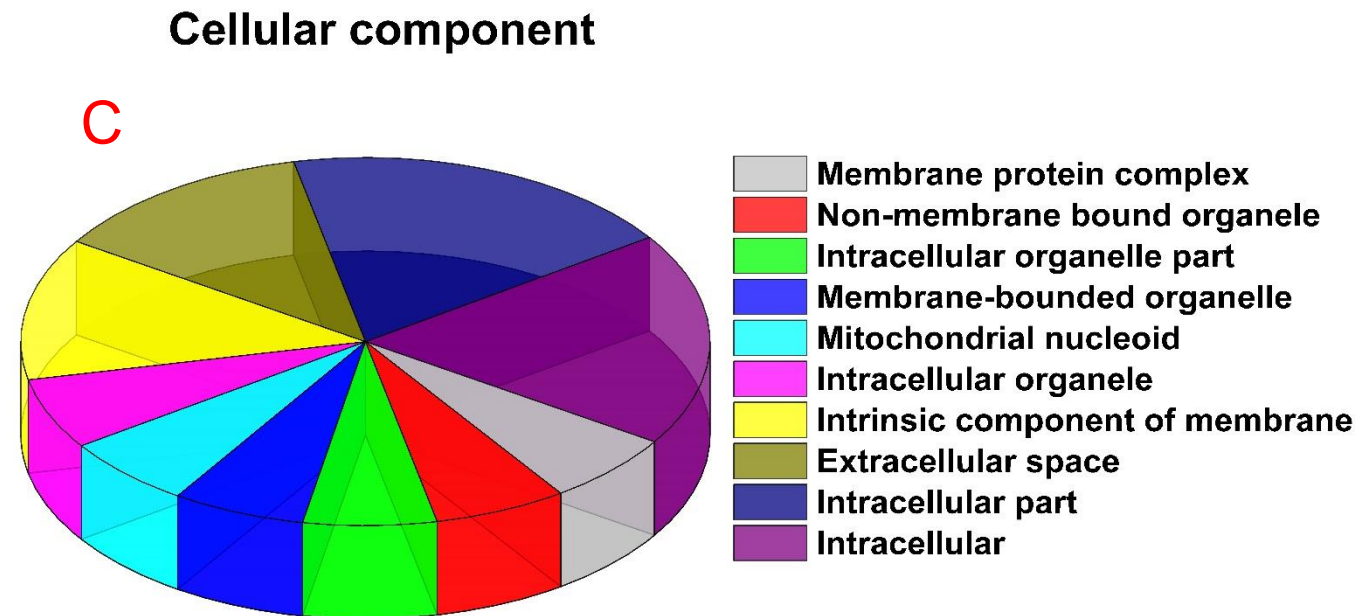
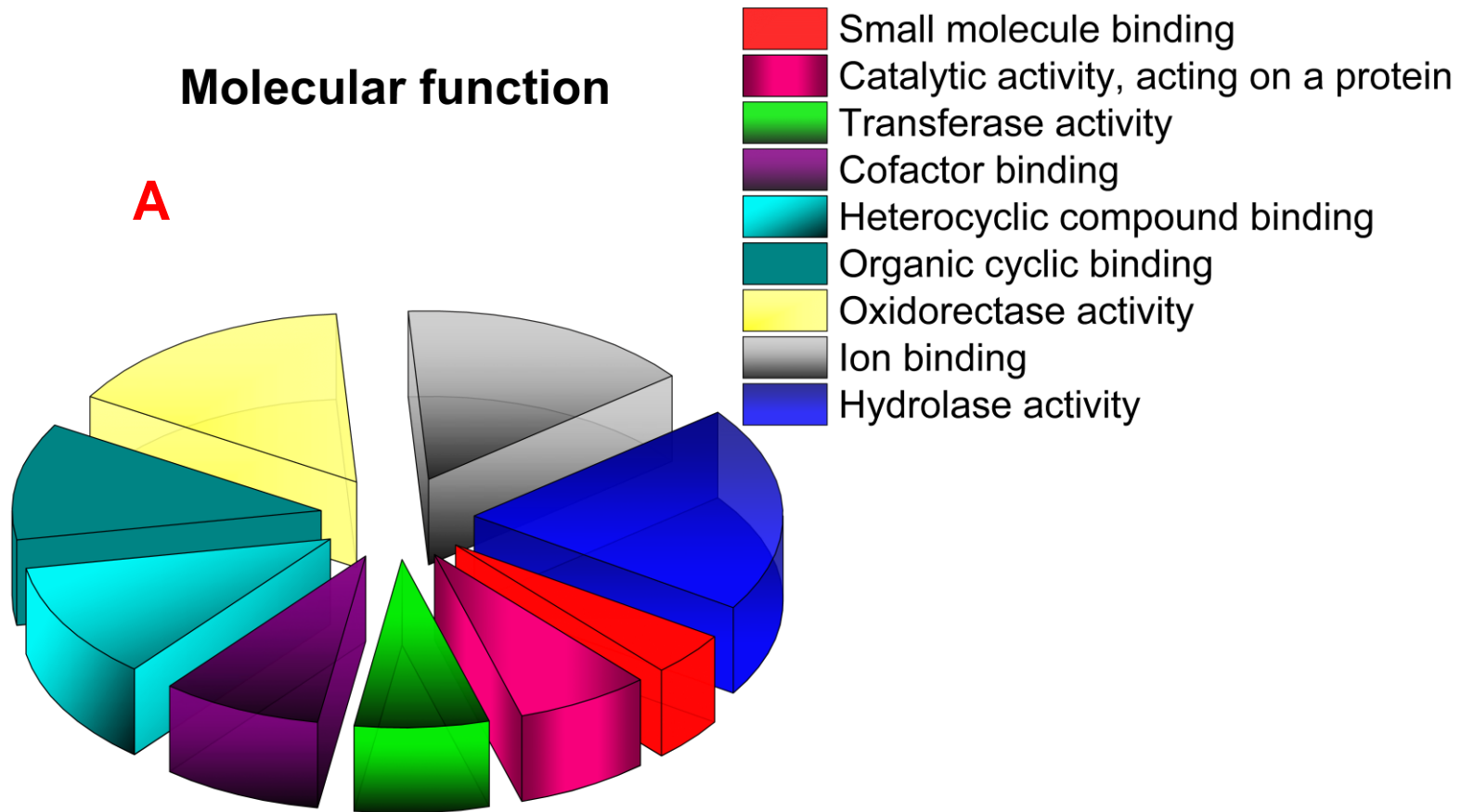


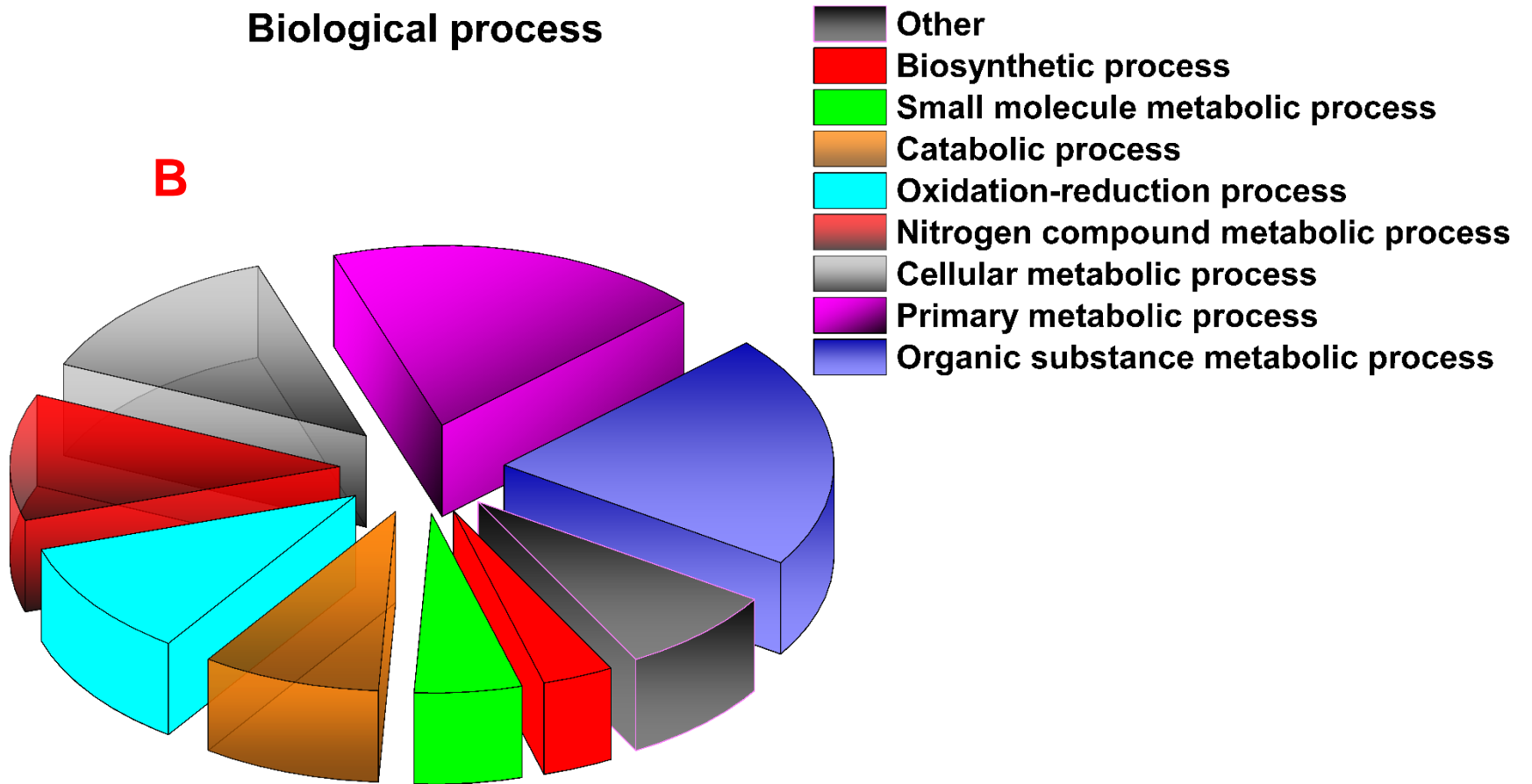
Figura 32. A-C: Distribuição geral de termos GO dentre as proteínas reguladas em 9DAI por *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso. A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celulares.

Molecular function

A



Biological process

B

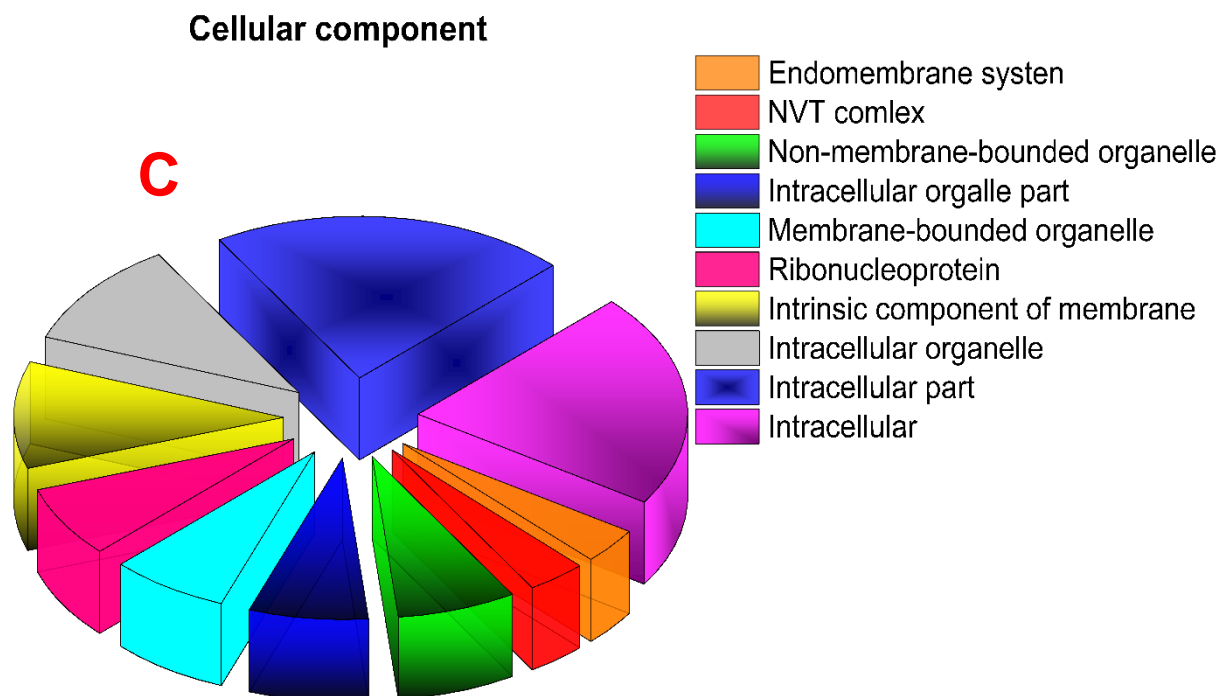
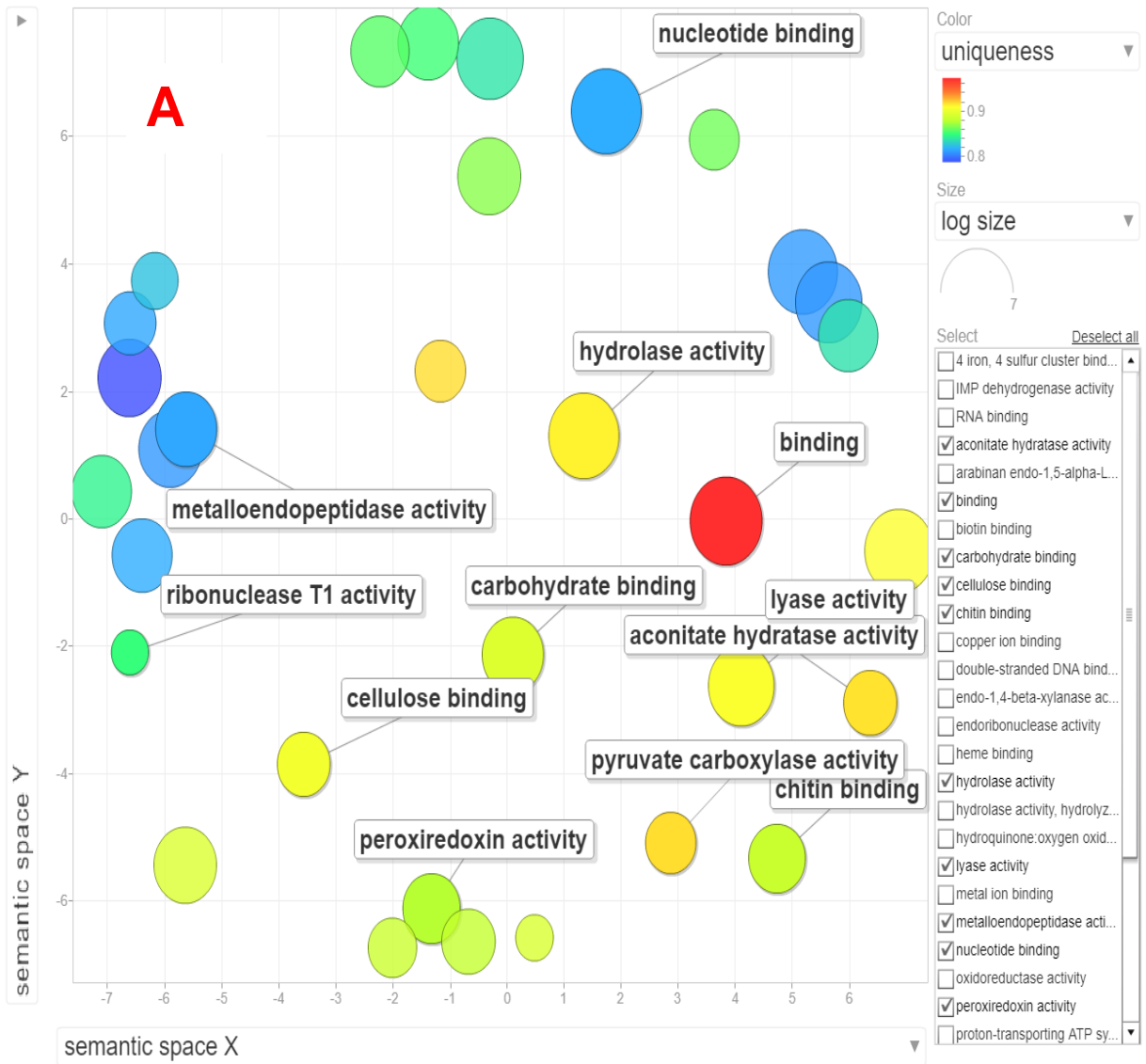
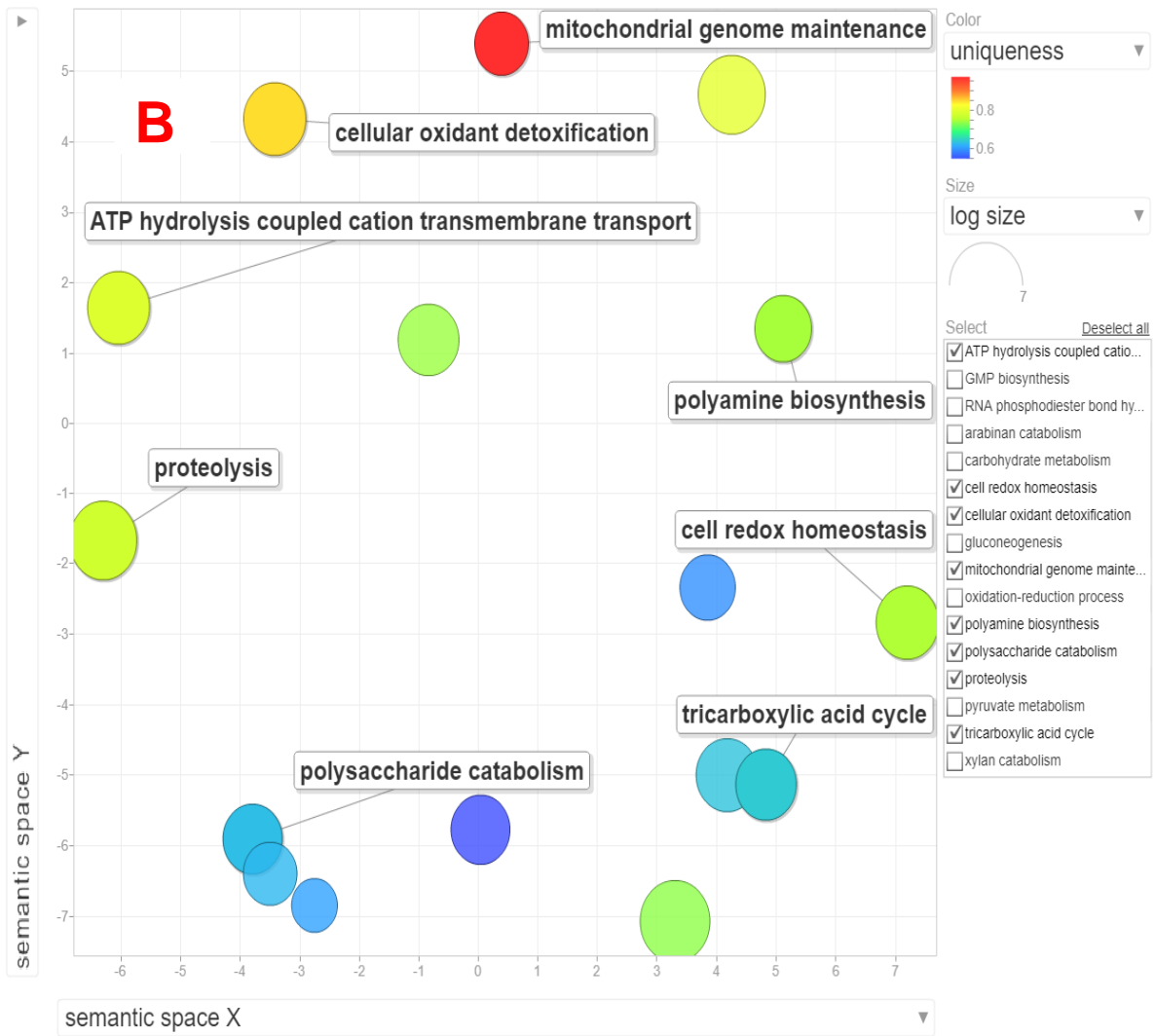


Figura 33. Distribuição geral de termos GO dentre as proteínas reguladas em 12DAI por *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso. A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celulares





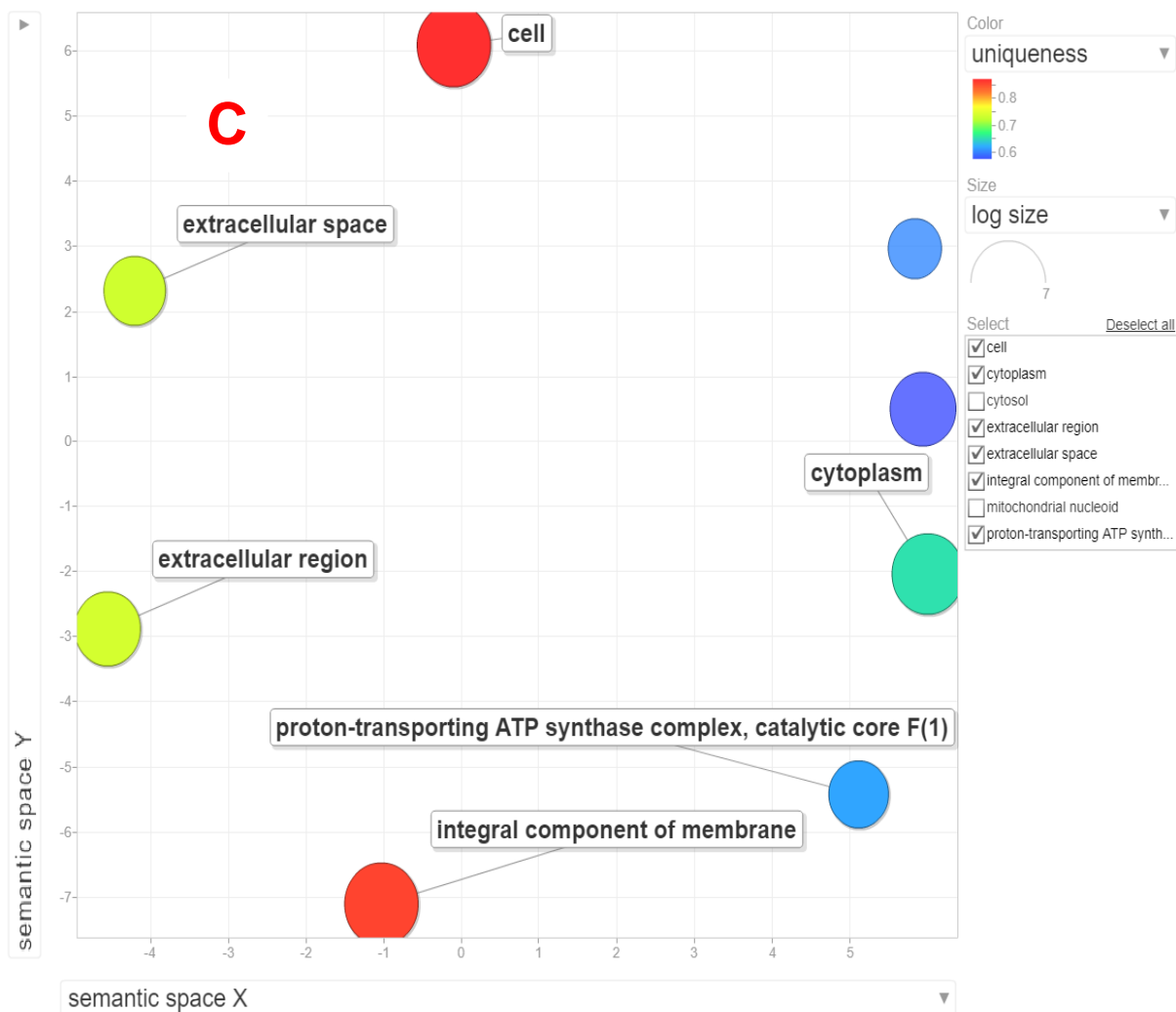
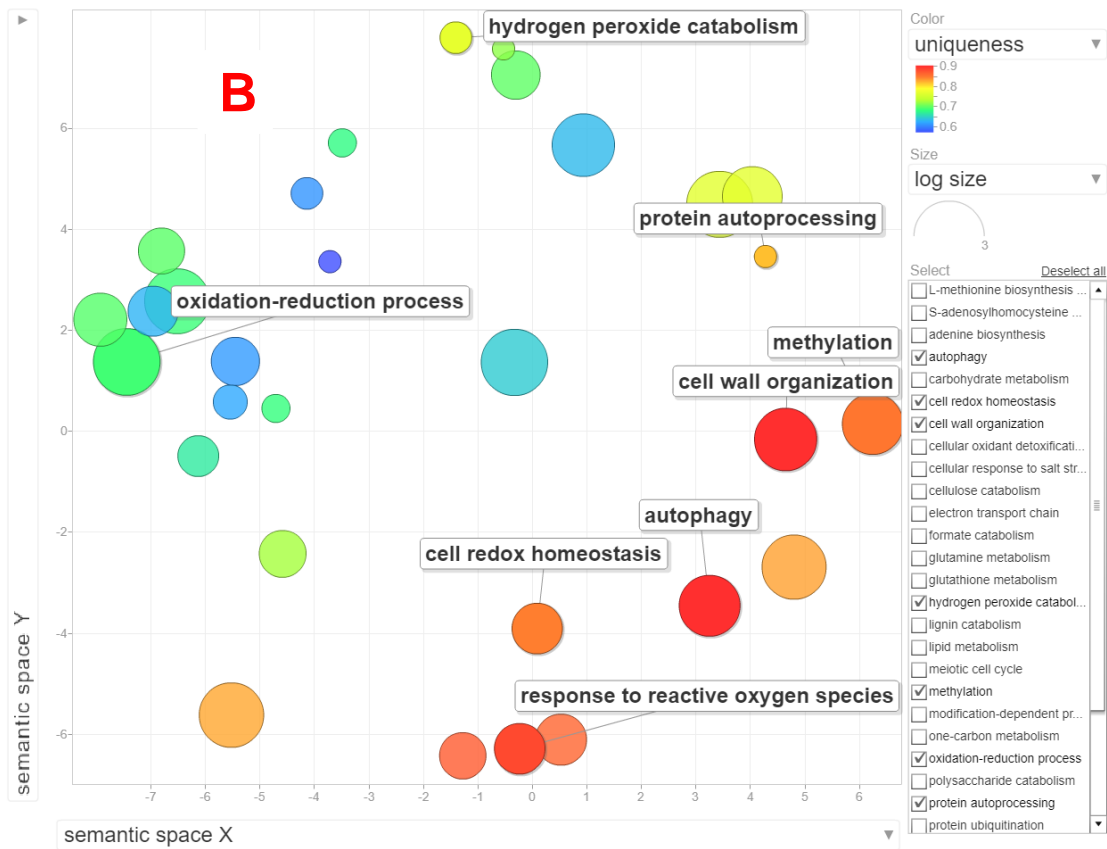
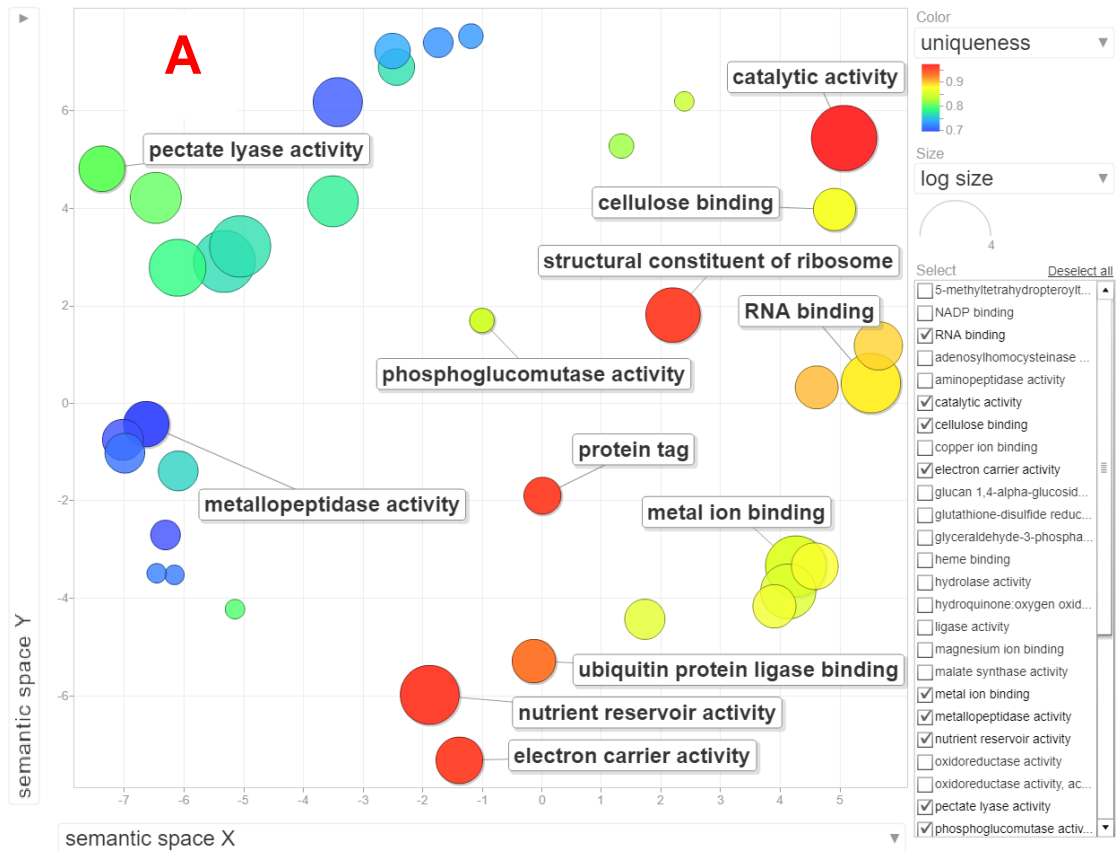


Figura 34. A-C: Agrupamento semântico das proteínas reguladas em 9DAI (eixos x e y), correlação com frequência absoluta no conjunto de proteínas (tamanho dos círculos) e similaridade com outros termos (escala de cores). A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celulares.



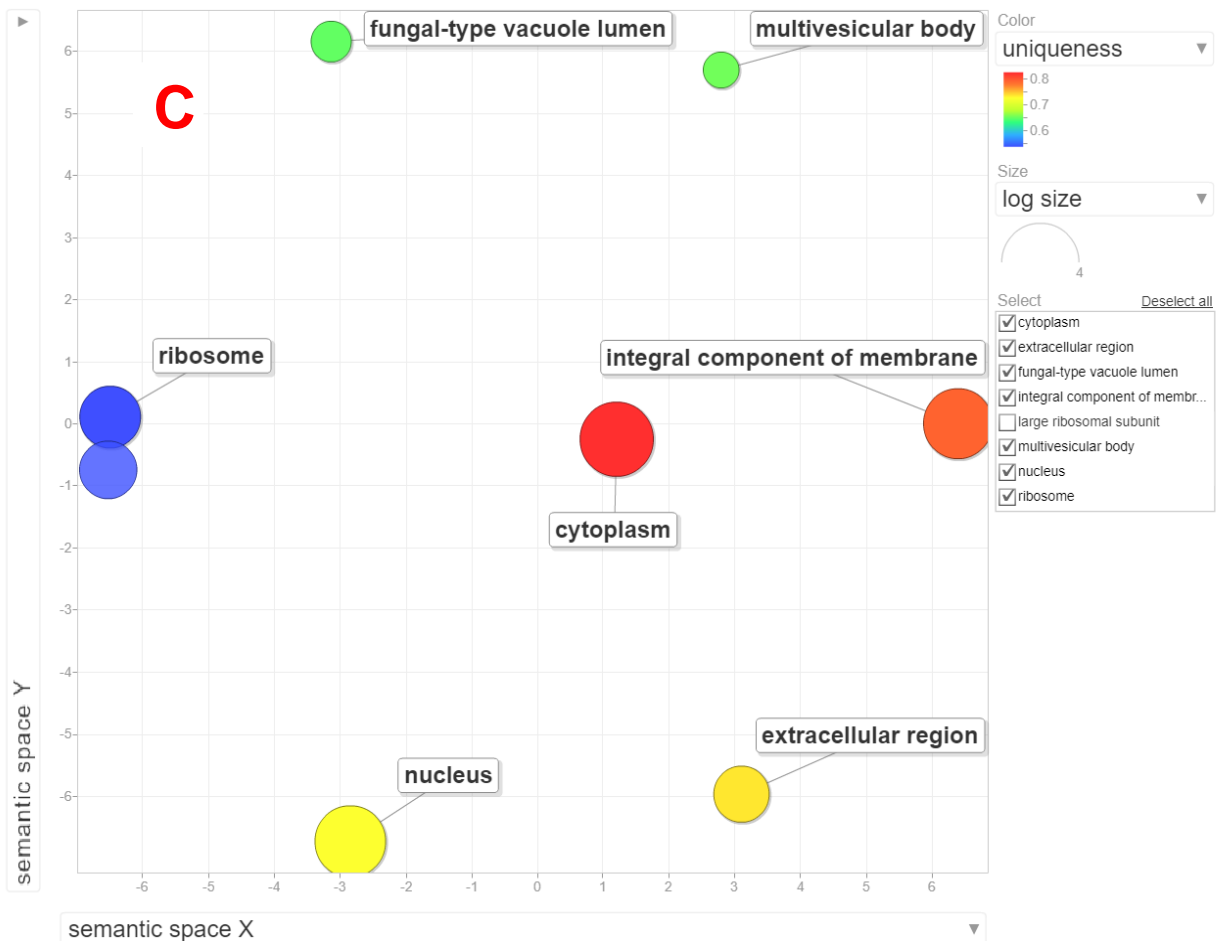


Figura 35. A-C: Agrupamento semântico das proteínas reguladas em 9DAI (eixos x e y), correlação com frequência absoluta no conjunto de proteínas (tamanho dos círculos) e similaridade com outros termos (escala de cores). A: Funções moleculares; B: Processos biológicos; C: Componentes celulares.

5. Discussão

5.1 Análise Gene Ontology (GO)

As três classificações de termos de Gene Ontology (GO): função molecular, processos biológicos e componente celular foram enriquecidas durante todos os dias avaliados, tanto no dados transcritômicos quanto proteômicos. Esses dados mostram a complexidade da resposta do macrobasidiomiceto EF88 em relação ao cultivo em torta de pinhão-manso. A categoria de função molecular apresentou o maior número de subcategorias de termos GO, e dentro dos quais se destacaram: atividade transportadora e atividade de oxirretudases. Em relação as subcategorias de processos biológicos se destacam: resposta ao *stress*, detoxificação, resposta a substância tóxica, celular detoxificação enriquecidos em 11DAI.

No que se refere aos dados proteicos, a categoria componente celular apresentou maior números de subcategorias (11) em ambos os dias analisados, das quais se destacam os processos intracelulares. Já entre as subcategorias de processos biológicos, destacam-se: processo metabólico de nitrogênio, processo metabólico de substâncias orgânicas e processo de oxidação-redução. Com relação a função molecular, duas subcategorias de termos GO foram mais abundantes: atividade hidrolase, principalmente atividade de metalopeptidase e atividade de oxireductase.

Em 11 DAI GO relacionados a atividade antioxidante está enriquecido, indicando que o microrganismo está sofrendo um *stress* oxidativo e dessa forma aciona enzimas antioxidantes para manter a homeostase redox do organismo. Os resultados de *Gene Ontology* proteicos indicam que o cultivo de *P. Pulmonarius EF88* em torta de pinhão-manso pode desencadear um estresse oxidativo, processos biológicos relacionados *cell redox homeostasis* e *cellular oxidant detoxification* foram identificados tanto em 9DAI quanto em 12DAI.

Segundo Inari, a micotoxina PAT desencadeia um estresse oxidativo na levedura *Sporobolomyces* sp, que em resposta a esse desequilíbrio ativa a

expressão de sistemas antioxidantes e de desintoxicação celular. A análise transcritômica de comunidades microbianas encontradas em resina de pinheiro, substrato rico compostos terpênicos, identificou 40 gêneros bacterianos presentes nessa microbiota. Também foram identificados genes envolvidos na degradação de terpenos, incluindo o cluster gênico (dit) envolvido na via de degradação de terpenos acíclicos. Os GOs enriquecidos nesse trabalho estão relacionados a atividade transportadora, NADH dehydrogenase e hidrolase de éster carboxílico (Vilanova et al., 2014).

5.2 Metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas

Diferentes enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas estão reguladas positivamente durante o crescimento de *P. pulmonarius* EF88 em torta de pinhão-manso. Resultados de expressão diferencial *in silico* indicaram que os genes *axIA* e NCU00937 que codificam para *Alpha-xylosidase* e *β-glucuronidase*, respectivamente, estavam modulados positivamente no cultivo de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica. No entanto, nos dados de RT-qPCR apenas o gene NCU00937 estava diferencialmente expresso no cultivo tóxico, a expressão do gene *axIA* não diferiu estatisticamente do cultivo controle em 3DAI e 7DAI, em 11DAI a expressão foi negativa.

Análises de expressão diferencial de genes, *Gene Ontology- GO* e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-KEGG* indicam que genes e proteínas envolvidas na degradação de lipídeos, carboidratos foram encontrados tanto na cultivo tóxico quanto no cultivo controle. A torta de pinhão-manso tem em sua constituição frações hemicelulósicas (25%), lignina (24%), proteínas (46-63%), lipídeos (19%) e minerais (Gomes, 2015). Dessa forma, vias relacionadas a degradação de carboidratos e lipídeos se tornam essenciais para a sobrevivência de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso, sendo assim estão acionadas pelo fungo em ambos os substratos, independente da presença do éster de forbol. No entanto, o cultivo em substrato tóxico intensificou a expressão gênica de proteases e do metabolismo de nitrogênio.

5.3 Influência da molécula tóxica de éster de forbol na expressão diferencial de genes em *P. pulmonarius* EF88

Os ésteres de forbol presentes na torta do pinhão-manso são diterpenos tiglane e podem agir no organismo de duas formas; aguda acarretando uma resposta inflamatória intensa ou crônica que leva a formação de tumores, a intensidade da ação desse composto no organismo depende de sua estrutura química (Makkar *et al.*, 1998; Makkar e Becker, 2009). A atividade biológica do éster de forbol é altamente específico-estrutural, mesmo em concentrações baixas podem causar intoxicação (Goel *et al.*, 2007). Diferentes formas de PE podem ativar vias distintas na resposta celular, e dessa forma, cada organismo pode apresentar sintomas distintos, como a formação de tumores, inflamação, diferenciação e apoptose nos tecidos animais (Goel *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2018).

Esses diterpenos também podem ser usados como agentes antimicrobianos e antivirais (Insanu *et al.*, 2013). Trabalhos anteriores mostraram a interferência desse composto no crescimento fúngico, onde apenas 13 espécies de basidiomicetos, de um total de 30, foram capazes de crescer em meio seletivo a base de pinhão-manso (Gomes, 2015).

A análise dos genes diferencialmente expressos de *P. pulmonarius* revelou que os genes reprimidos no cultivo do macrofungo em torta tóxica estão relacionados em sua maioria com funções celulares como: replicação, regulação transcricional, sinalização e complexos proteicos.

Diante desses resultados foi possível inferir que a molécula tóxica de éster de forbol interfere na resposta metabólica e desenvolvimento inicial do macro-basidiomiceto EF88. Tal comportamento também fica evidenciado nos resultados transcritômicos obtidos pela análise de *Gene Ontology*, onde processos biológicos como: processamento de forquilhas de replicação, regulação negativa de recombinação de DNA, manutenção de fidelidade na replicação de DNA, resposta ao estresse, resposta a substância tóxica e destoxificação celular estão enriquecidos.

Os ésteres de forbol podem causar danos nas células do fungo e a recuperação dos danos e equilíbrio metabólico exige um alto gasto energético e dessa forma, outras vias metabólicas são reduzidas. Essa hipótese também

foi levantada por Ianiri *et al.* (2016) que analisaram o transcrito da levedura *Sporobolomyces sp.* em resposta a exposição e degradação da micotoxina patulina produzida por *Penicillium expansum*, genes envolvidos nos processos de síntese e modificação de proteínas, e genes que codificam para proteínas envolvidas no transporte de íons, divisão celular e ciclo celular foram reprimidos na presença da micotoxina.

5.4 Mecanismo de proteção: Heat Shock protein e Hidrofobinas

Nos dados *in silico* de expressão diferencial de genes, foram identificados DEGs que codificam para proteínas de choque térmico ou *heat shock protein*- HSP. Os genes *PLEOSDRAFT_1090083* e *hsp16*, estavam expressos positivamente na torta tóxica em 7DAI com *LogFoldChange* de 3.44 e 2.3, respectivamente. O gene *PLEOSDRAFT_1090983* foi identificado tanto em 7DAI quanto em 11DAI, com *LogFoldChange* de 2.15 e 2.07, respectivamente. Os dados proteicos suplementam os dados de expressão diferencial de genes. A proteína A0A067NYT5, identificada como uma *heat shock protein*, estava regulada positivamente no cultivo tóxico 9D. Essas proteínas são conhecidas por serem induzidas sob uma variedade de fatores de estresse como na presença de metais pesados, substâncias tóxicas e temperatura elevadas. As HSPs impedem a desnaturação, dobramento incorreto ou agregação em tais condições de estresse e são capazes de restabelecer o equilíbrio entre síntese de proteínas, montagem e desmontagem de complexos proteicos e degradação (Hall, 2002; Kregel, 2002).

A análise transcritômica *in silico* do basidiomiceto *P. pulmonarius* cultivado em torta de pinhão-manso revelou que genes que codificam para proteínas hidrofobinas, foram superexpressas em todos os momentos avaliados (3, 7 e 11 dias). Os resultados da expressão gênica por RT-qPCR confirmaram a modulação positiva desses genes em relação ao cultivo controle.

Wösten e Scholtmeijer, (2015) em uma publicação recente sobre o estado da arte das proteínas hidrofobinas, afirmam que estas desempenham um papel importante para o crescimento e desenvolvimento de fungos filamentosos. Hidrofobinas são proteínas de baixo peso molecular (≤ 20 kDa) secretadas exclusivamente por fungos. São constituídos de 100 a 140

aminoácidos com 8 resíduos de cisteína conservados (Bayry *et al.*, 2012; Wösten e Scholtmeijer, 2015).

Essas proteínas se montam em filmes estáveis anfipáticos que cobrem células fúngicas, e dessa forma, contribuem para a hidrofobicidade superficial. A formação desse filme permite o crescimento de hifas fúngicas e os protegem em ambientes desfavoráveis (Peddireddi *et al.*, 2006). A hidrofobicidade superficial é importante também em processos de associação de hifas nas estruturas reprodutivas, dispersão de esporos aéreos e adesão de agentes patogênicos às estruturas hospedeiras (Bayry *et al.*, 2012)

De acordo com análise de sequências as hidrofobinas podem ser divididas em duas classes I e II. Hidrofobinas pertencentes a classe I formam membranas estáveis do tipo amilóide e apenas são rompidas em condições severas, como a utilização de ácidos fortes (ácido trifluoroacético e ácido fórmico), enquanto as hidrofobinas da classe II formam estruturas menos resistentes e podem ser dissociados usando etanol 60%, SDS 2% ou por exposição a pressão (Morris *et al.*, 2011; GrunéR *et al.*, 2012; Wösten e Scholtmeijer, 2015). Em ambas as classes, as membranas parecem ter múltiplas funções, como adesão, formação de revestimentos em esporos ou corpos frutíferos, e até mesmo facilitar a formação de estruturas ou complexos (Kubicek *et al.*, 2008; GrunéR *et al.*, 2012).

Essas pequenas proteínas podem ser secretadas em respostas a mudanças no desenvolvimento fúngico, condições ambientais (Plett *et al.*, 2012), resposta e proteção a condições estressantes de crescimento (Mukherjee *et al.*, 2006; Ying *et al.*, 2006).

Dados do genoma e análises transcriptomas do macro-basidiomicetos halofílico *Wallemia ichthyophaga* indicou que as hidrofobinas podem desempenhar função importante na fortificação da parede celular de *W. Ichthyophaga* contra ambientes extremos saturados com NaCl (Zajc *et al.*, 2013). O transcrito do macro-basidiomiceto *Rigidoporus microporus* cultivado nos resíduos da seringueira *Hevea brasiliensis* revelou que os genes que codificam para hidrofobinas foram diferencialmente expressos durante todo o crescimento fúngico (Oghenekaro *et al.*, 2016) .

Os resultados de RT-qPCR mostraram que a expressão relativa dos genes que codificam para hidrofobinas foi maior nos primeiros dias analisados

(3 e 7DAI), e nos dados proteômicos, a proteína A0A067NYT5 foi modulada positivamente somente no 9º dia de cultivo. Diante disso, proteínas como *heat shock* e hidrofobinas podem fornecer proteção ao estresse causado ao fungo *P. pulmonarius* no cultivo em substrato tóxico de pinhão-manso e essa proteção pode ser fundamental para sobrevivência inicial do basidiomiceto em torta de pinhão-manso.

5.5 Genes e proteínas do EF88 envolvidos na degradação dos ésteres de forbol presentes na torta do pinhão-manso

5.5.1 Hidrolases de ésteres carboxílicos

As hidrolases de ésteres carboxílicos (3.1.1.x) mais conhecidas pertencem a superfamília dobra alfa/beta hidrolase, e hidrolisam as ligações éster em soluções aquosas formando um álcool e um ácido carboxílico (Hotelier et al., 2004; Wang et al., 2010). Essas enzimas estão envolvidas diretamente da degradação de compostos xenobióticos dentre os quais se destacam as carboxilesterases (3.1.1.1), arilesterases (3.1.1.2), lipases (3.1.1.3), acetyl xylan esterases (EC 3.1.1.72) e feruloyl esterases (EC 3.1.1.73) (Chang et al., 2008; Sood et al., 2016; Haernvall et al., 2017). Esterases como acetyl xylan esterase e feruloyl esterase participam da degradação completa da parede celular vegetal por microrganismos celulolíticos (Hashimoto et al., 2010).

Os dados de expressão diferencial mostraram que o gene *CHU_2040* que codifica para uma enzima pertencente a família 1 das carboidrato esterase, estava diferencialmente expresso pelo EF88 no cultivo tóxico. Os resultados de RT-qPCR confirmaram a expressão gênica positiva em relação ao tratamento controle. Os dados do secretoma global indicaram que a proteína A0A067NZ51, identificada como uma carboxiesterase, estava regulada positivamente no cultivo de *Pleurotus pulmonarius* em substrato tóxico.

A família 1 das carboidratos esterases (CE1) representa a maior e mais diversificada família de CE, dentre essa variedade enzimática, podemos destacar as classes de *acetilxilan* esterases (EC 3.1.1.72), feruloil esterases (EC 3.1.1.73), cinamoil esterases (EC 3.1.1.-), carboxilesterases (EC 3.1.1.1), diacilglicerol O-aciltransferases (EC 2.3.1.20) (Lombard et al., 2014).

Carboxiesterases são enzimas encontradas em macro e microrganismos que catalisam a clivagem de ligações éster simples e triglicérides de cadeia curta ($C < 8$) (Chahinian et al., 2009; Sood et al., 2016; Hussein et al., 2015). Possuem preferência por substratos solúveis em água, são enzimas que geralmente não requerem cofator e exibem alta regioespecificidade e estereoespecificidade ao substrato (Panda & Gowrishankar, 2005; Hussein et al., 2015). As carboxiesterases desempenham papel importante na degradação e destoxificação de vários compostos xenobióticos como piretróides e organofosfato encontrados em inseticidas e herbicidas (Wheelock et al., 2008).

Trabalhos anteriores já mostraram a participação de carboxilesterase na degradação do éster de forbol 12-O-Tetradecanoyl Phorbol 13-Acetate -TPA (Mentlei et al., 1986). Essas enzimas atuam na hidrólise da ligação éster C-12 do esqueleto principal tigliano, o principal metabólito dessa reação é o forbol 13-acetate (PA) (Mentlei et al., 1986). Esterases e lipases microbianas são apontadas como as principais enzimas envolvidas na biodegradação dos ésteres de forbol, enzimas oxidativas e proteases podem atuar na degradação de produtos secundários (Gomes et al., 2018).

5.5.2 Metaloprotease

Proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Essas enzimas são classificadas com base no tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relação evolutiva com referência à estrutura (Barett, 1994; Rao et al., 1998).

De forma geral, as proteases podem ser divididas em dois grupos: I) Exopeptidases que atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal, as enzimas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo. As exopeptidases que atuam na região carboxi terminal livre liberam um único aminoácido ou um dipeptídeo. ii) Endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N- e C-terminal (Rao et al., 1998).

Além disso, as proteases podem ser classificadas em sete grupos principais: serina, cisteína, aspartato, metaloprotease, glutâmicas, peptidases treonina e peptídeo-liase da asparagina não-hidrolítica (Rawlings et al. 2011;

Silva 2017; da Silva et al., 2017). Essa classificação baseia-se no mecanismo de ação de cada enzima e nos grupos funcionais do sítio ativo (Rao et al., 1998; Sabotic et al., 2007; Inácio et al., 2015). As Metaloproteases são os mais diversos tipos catalíticos de proteases, e precisam de um íon metálico divalente para sua atividade, como zinco e cobalto (Rao et al., 1998).

Tanto dos dados transcritômicos quanto proteômicos indicaram que a atividade de metaloproteases foi maior no cultivo de *P. pulmonarius* em torta de pinhão-manso tóxica em relação ao cultivo controle. Como foi abordado no capítulo II, as atividades de proteases foram maiores em *P. pulmonarius* no cultivo em torta de pinhão-manso tóxica. Inúmeros trabalhos relatam que a torta de pinhão-manso tem sido um substrato promissor para produção de proteases (Gomes et al., 2018).

Fungos cultivados em resíduos agroindustriais apresentam alta expressão de proteases extracelulares como metaloproteases e serina proteases, enzimas de ampla especificidades de substrato, essa expressão foi induzida pela presença de uma fonte de nitrogênio presente nos substratos lignocelulósicos (Zorn et al., 2005; Scully et al., 2011).

Entretanto, já está bem caracterizado que algumas metaloproteases conseguem hidrolisar ligações éster (Bornscheuer et al., 2004; Pedersen et al., 2002; Grogan, 2009; Kim et al., 2000). Dessa forma, essas enzimas poderiam ser protagonistas, juntamente com as esterases, na degradação dos ésteres de forbol. Baseado nos resultados de expressão relativa (RT-qPCR) e no secretoma, as metaloproteases ainda foram diferencialmente expressas mesmo após a drástica redução dos ésteres de forbol, diferentemente das esterases, que só foram diferencialmente expressas em relação ao cultivo tóxico quando os níveis de esterases de forbol eram altos. Com isso, foi possível inferir que as metaloproteases podem exercer dois papéis no metabolismo do basidiomiceto *P. pulmonarius*: i) degradando a fonte de nitrogênio do substrato (função essencial para sobrevivência do fungo), ii) degradando os ésteres de forbol em decorrência de sua ambiguidade de ação.

5.5.3. Os genes do Citocromo P450

Os macro-basidiomicetos de podridão branca são os maiores degradadores de substratos lignocelulósicos, e usados frequentemente para biodegradar poluentes aromáticos e compostos xenobióticos (Mori e Kondo, 2002; Arun e Eyini, 2011; Chen *et al.*, 2016; Feofilova e Mysyakina, 2016). Enzimas ligninolíticas permitem que os fungos consigam crescer em substratos recalcitrantes de estruturas aleatórias, uma vez que essas enzimas não necessitam de alta especificidade para atuar sobre o substrato, essa característica provavelmente decorre de uma adaptação dos fungos as diversas estruturas da lignina (Bonugli-Santos *et al.*, 2012). Dessa forma conseguem atuar sobre uma gama de compostos (Bonugli-Santos *et al.*, 2012; Feofilova e Mysyakina, 2016).

Além de secretar enzimas responsáveis pela degradação de materiais lignocelulósicos, os macro-basidiomicetos possuem um sistema intracelular de metabólicos versáteis, uma vez que os fragmentos aromáticos gerados pela degradação da lignina, são metabolizados e mineralizados intracelularmente (Hirosue *et al.*, 2011; Ichinose e Wariishi, 2013). Dessa forma, a ação de uma gama de genes estão envolvidas na degradação de substâncias xenobióticas, como por exemplo, os genes do Citocromo P450.

Os genes do Citocromo P450 estão presentes no genoma de quase todos os organismos e codificam uma superfamília de monooxigenases contendo hemo que metabolizam uma grande variedade de compostos xenobióticos como hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), alcanos, terpenos, herbicidas e inseticidas (Bernhardt, 2006; Hsu *et al.*, 2011; Urlacher e Girhard, 2012; Girvan e Munro, 2016). As monooxigenases catalisam a incorporação de um único átomo de oxigênio em um substrato orgânico e redução concomitante do outro átomo a água (Bernhardt, 2005; Ichinose *et al.*, 2012). A diversidade de aplicação dessas enzimas se dá justamente por essa capacidade de inserir átomos de oxigênio em posições específicas de moléculas complexas (Girvan & Munro, 2016). Em fungos, também participam da síntese de esteróis de membrana e no metabolismo de carbono lipídico (Hsu *et al.*, 2011).

Nos macro-basidiomicetos as diferentes funções dessas monooxigenases versáteis podem ter contribuído para adaptações

metabólicas, como degradação da lignina, produção de metabólitos secundários e degradação de xenobióticos (Ichinose e Wariishi, 2013). De acordo com dados publicados por Suzuki *et al.* (2012) o genoma do basidiomiceto *Phanerochaete carmosa* foi enriquecido por genes que codificam P450 monooxigenases e essas enzimas podem estar relacionadas com a capacidade do fungo em degradar extrativos fenólicos e de colonizar tanto madeiras folhosas (heartwood) como coníferas (softwood). Em outro trabalho, Hirosue *et al.* (2011) relatam que o macro-basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* degradou substâncias aromáticas como carbazole, dibenzofurano, dibenzotiofeno, fluoreno, bifenilo e naftaleno. Segundo esse autores os resultados obtidos confirmam a capacidade desses fungos em metabolizar uma grande variedade de produtos petroquímicos aromáticos e poluentes ambientais por meio de reações mediadas por monooxigenases do Citocromo P450.

No presente trabalho, os resultados *in silico* de expressão diferencial gênica, indicaram que 9 genes que codificam para essa superfamília de oxirredutases foram expressos positivamente em todos os dias de cultivo. Os resultados de expressão gênica via RT-qPCR também mostraram expressão positiva no cultivo tóxico, em pelo menos dois momentos, dos três analisados. Ainda sobre os dados de RT-qPCR, é importante ressaltar a similitude entre o comportamento dos genes do Citocromo P450. Os genes apresentaram maior expressão em 3DAI e 7DAI, já em 11DAI (degradação de 90% dos ésteres de forbol) a expressão diminuí ou se torna negativa em relação ao cultivo controle. O secretoma de *P. pulmonarius* mostrou que enzimas do complexo *citocromo b5* estavam reguladas positivamente no cultivo de *P. pulmonarius* EF88 em substrato tóxico.

Existem dois sistemas enzimáticos redox centrais para reduzir as enzimas P450 eucarióticas, a oxidoredutase P450 (POR) e as citocromo b5 (cyt b5; b5 redutase) (Syed *et al.*, 2011). O complexo *cyt b5* desempenha um papel importante nas reações do citocromo P450, essas enzimas são capazes de doar o segundo elétron dos dois requeridos pelo citocromo P450, aumentando a eficiência da reação e a afinidade com o substrato (*Parkinson et al.*, Syeda *et al.*, 2011).

Os ésteres de forbol são moléculas sensíveis ao oxigênio e podem ser rapidamente degradados por oxidação externa e autooxidação (Gogoi et al., 2014; Goel et al., 2007). Diversos processos físicos de degradação desses diterpenos usam como princípio a degradação oxidativa (Gomes, 2018). Devappa et al. (2010) sugerem que enzimas oxidativas da microbiota do solo podem estar envolvidas na degradação dos diterpenos presentes na torta de pinhão-manso.

Trabalhos anteriores também apontam a participação dessas enzimas na degradações de outros terpenos. Segundo Morgan e Wyndham, (2002) e Smith et al. (2004) monooxigenases do citocromo P450 estão diretamente envolvidas na degradação do diterpenóides abietano por cepas bacterianas de *Pseudomonas*. Quando o gene *tdtD* que codifica uma monooxigenase do citocromo P450 sofreu *knockout*, limitou o crescimento e a capacidade de degradação dos diterpenos tricíclicos pela cepa de *Pseudomonas diterpeniphila* A19-6^a (Morgan e Wyndham, 2002). De acordo com Martins et al. (2017), enzimas P450 foram responsáveis pela biodegradação do terpenóide ácido labanólico pelo fungo *Penicillium janczewskii*. Monooxigenases do citocromo P450 foram diferencialmente secretadas pelo fungo na presença do terpenóide, e a bioconversão do mesmo foi inibida na presença de um inibidor de P450.

5.5.4 Proteínas hidrofobinas

Dados da literatura fornecem informações relevantes sobre essas enzimas e suas possíveis ações em processos de degradação de compostos aromáticos recalcitrantes e na fixação na parede celular vegetal, e serão discutidas a seguir.

O fungo *Aspergillus oryzae* foi capaz de hidrolizar o polímero *polybutylene succinate-coadipate* (PBSA) em decorrência da ação de enzimas de polyesterase como a CutL1. Takahashi et al. (2005) investigaram outras possíveis proteínas envolvidas no processo de degradação desse composto. O gene que codifica para a hidrofobina RolA foi altamente transcrito pelo fungo *A. oryzae* cultivado em meio com PBSA como única fonte de carbono. A co-expressão dos genes *RolA* e *CutL1* em uma cepa recombinante de *A. oryzae*

aumentou sua capacidade de degradar o polímero. Tais resultados indicam que a expressão da hidrofobina RoIA estimula a hidrólise de PBSA pela enzima CulL1. Segundo os autores, RoIA e CutL1 podem formar um mecanismo molecular para a degradar compostos hidrofóbicos, no caso o polímero *polybutylene succinate-coadipate*. A hidrofobina ao ser adsorvida a superfície hidrofóbica da molécula de PBSA recruta a enzima CutL1, ocasionando o seu acúmulo e assim estimula a hidrólise do polímero em questão. O mecanismo e cinética da interação entre RoIA-PBSA não está totalmente elucidado, no entanto, os resíduos de aminoácidos L137 e L142 localizados no loop C7 – C8 da proteína RoIA está diretamente envolvido em sua interação com materiais sólidos (Tanaka *et al.*, 2014). Para Tanaka *et al.*,(2017) existe uma interação iônica entre hidrofobinas e cutinases e essa interação pode ser comum entre os fungos do gênero *Aspergillus* e demais fungos filamentosos.

As hidrofobinas-HFB também foram relatadas por aumentar a taxa de degradação enzimática do polímero recalcitrante de *polyethylene terephthalate-PET* (Espino-Rammer *et al.*, 2013; Ribitsch *et al.*, 2015). Hidrofobinas (HFB4 e HFB7E) da classe II isoladas de *Trichoderma sp.* estimularam a hidrólise enzimática do polímero aromático-alifáticos PET pelas cutinases, no entanto essa proteínas podem exibir propriedades diferentes no processo de degradação (Espino-Rammer *et al.*, 2013). Ribitsch *et al.* (2015) relatam ainda que a hidrólise de PET pode ser significativamente aumentada pela fusão de cutinases a hidrofobinas. Com a fusão dessas proteínas a degradação do polímero foi 16x maior em relação a enzima livre, enquanto que o *mix* enzimático com as enzimas individuais aumentou somente em 4x a hidrólise de PET. Esse aumento pode ser em decorrência de alterações conformacionais no centro ativo das cutinases (Ribitsch *et al.*, 2015)

De acordo com Mgbeahuruike *et al.* (2013), o macro-basidiomiceto *Phlebia brevispora* possui em seu genoma 10 genes que codificam para hidrofobinas a mais que o genoma do basidiomiceto patogênico *Heterobasidion annosum*, a partir desses dados os autores sustentam a teoria que a distribuição e o número de genes codificadores de hidrofobinas podem ser associados a preferências ecológicas nas espécies de basidiomicetos analisadas.

Foram identificados dois DEGs que codificam para hidrofobinas, em todos os tempos de cultivo. Em 3 DAI, esses genes apresentaram LogFoldChange de 4.82 e 3.03, em 7DAI o LogFoldChange foi de 3.36 2.14 e em 11DAI 3.57 e 2.09.

Diante de tais fatos, é possível que as hidrofobinas expressas positivamente no presente trabalho, interajam com a superfície hidrofóbica da torta de pinhão-manso e dessa forma auxiliam e potencializam a ação de enzimas necessárias para a sobrevivência do fungo no resíduo em questão. Conseqüentemente a ação dessas enzimas (esterases e proteases) que foram diferencialmente expressas, mesmo que de forma indireta, resulta na degradação dos ésteres de forbol. Dado o fato que essas proteínas possuem a capacidade de recrutar enzimas hidrolíticas necessárias para penetração de um substrato (Takahashi *et al.*, 2005).

Outra hipótese levantada está na interação direta dessas proteínas com a superfície hidrofóbica dos ésteres de forbol, uma vez que os DEGs que codificam para essas proteínas foram encontrados no bioensaio tóxico, estas por suas vez recrutam esterases ou lipases responsáveis pela degradação dessa molécula, similar ao modelo proposto por Takahashi *et al.* (2005), ilustrado pela figura 36. De acordo com Wang *et al.* (2016) a hidrofobina HFBI de *T. reesei* melhorou a hidrofobicidade da superfície da célula da levedura recombinante *P. pastoris* e dessa forma aumentou a atividade catalítica da lipase B de *Candida antarctica* CALB. Vários genes que codificam para proteínas hidrofobinas são encontrados no genoma dos fungos, esta variedade pode estar relacionada a diferentes funções funcionais, expressão diferencial ou relacionados a condições ambientais (Zajc *et al.*, 2013)

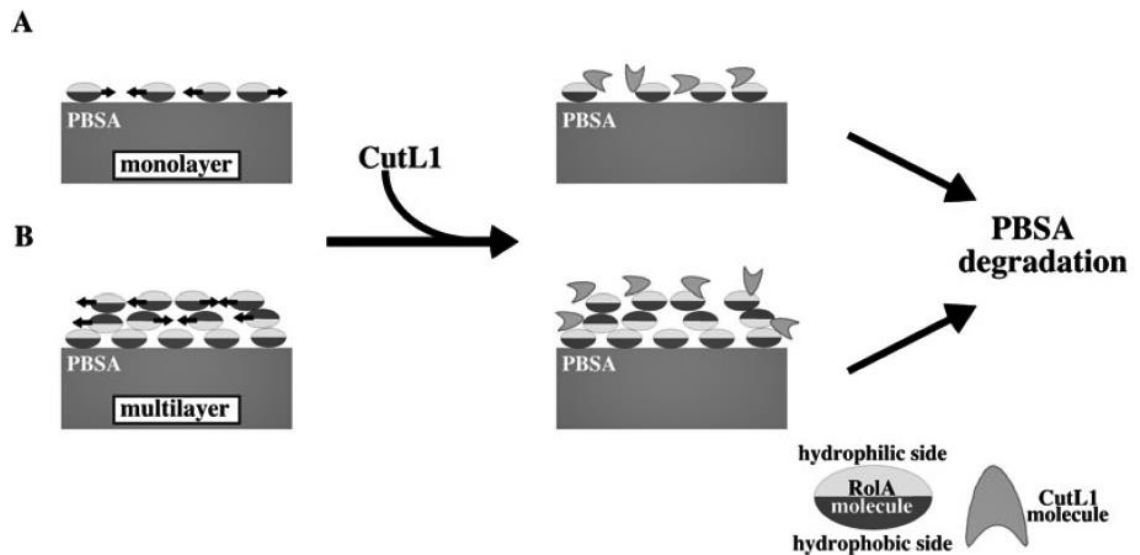


Figura 36. Modelo proposto por Takahashi et al. (2005) entre a interação entre polyesterase CutL1 e a proteína hidrofóbica RolA para degradação do polímero PBSA.

Como já foi abordado no capítulo I, os ésteres de forbol são diterpenos tetracíclicos do tipo tiglane que contém 4 anéis designados como A, B, C e D. Todos os seis tipos de ésteres de forbol (*Jatropha* factors C1–C6) encontrados no pinhão-mansão compartilham o mesmo esqueleto diterpênico (12-desoxi-16-hidroforbol), que se ligam por ligações éster a resíduos de ácidos graxos através do C-13 e C-16 (figura 2).

Esses compostos diterpenos podem ser degradados por transesterificação, hidrólise (química e enzimática) e como são moléculas sensíveis ao oxigênio, podem ser rapidamente degradados por oxidação externa ou autooxidação (Gogoi et al., 2014; Goel et al., 2007).

Baseados nos resultados *in silico* de expressão diferencial gênica, foram escolhidos 21 genes candidatos a biodegradação dos ésteres de forbol, por *P. pulmonarius*. Todos esses genes apresentaram expressão positiva em torta tóxica, a expressão também foi validada via RT-qPCR. Os genes que codificam para esterases, metaloprotease e monooxigenases do citocromo p450 podem desempenhar papel fundamental na degradação dos ésteres de forbol. Dados proteômicos indicam que essas proteínas estão reguladas positivamente no cultivo tóxico em 9D, dia em que a degradação se acentua.

Isto posto, a degradação dos ésteres de forbol pelo basiomiceto *P. pulmonarius* pode ocorrer em duas etapas:

- I) Degradação hidrolítica das ligações éster nas posições C-13 e C-16, mediadas por esterases ou metalloproteases, a clivagem dessa ligação causará a dissociação da molécula de forbol e de seus ácidos graxos (Figura 37). Atualmente a literatura ainda é escassa sobre os produtos gerados a partir da degradação dos ésteres de forbol, seja por métodos químicos, físicos ou biológico. No entanto, trabalho recente publicado por Ahluwalia et al. (2017) relata que a biodegradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso (microrganismo não publicado) gera subprodutos como forbol, ácido mirístico e ácido acético
- II) Degradação oxidativa dos possíveis produtos gerados na etapa I, por monooxigenases do citocromo p450. Segundo Kongmany et al. (2013) a oxidação e degradação dos ésteres de forbol por irradiação de plasma se inicia pelo radical hidroxila (\bullet OH). Isto posto, as p450 podem agir de forma similar ao modelo proposto por esses autores (Kongmany et al., 2013). As monooxigenases podem atuar sob as ligações duplas do anel A e / ou B da estrutura principal tigliane, adicionando um ou dois radicais \bullet OH. Tal reação acarretará na clivagem das ligações duplas e destruição dos aneis (figura 36). A degradação oxidativa dos ésteres de forbol podem gerar produtos finais como: ácidos carboxílicos, dióxido de carbono e água (Kongmany et al., 2013).

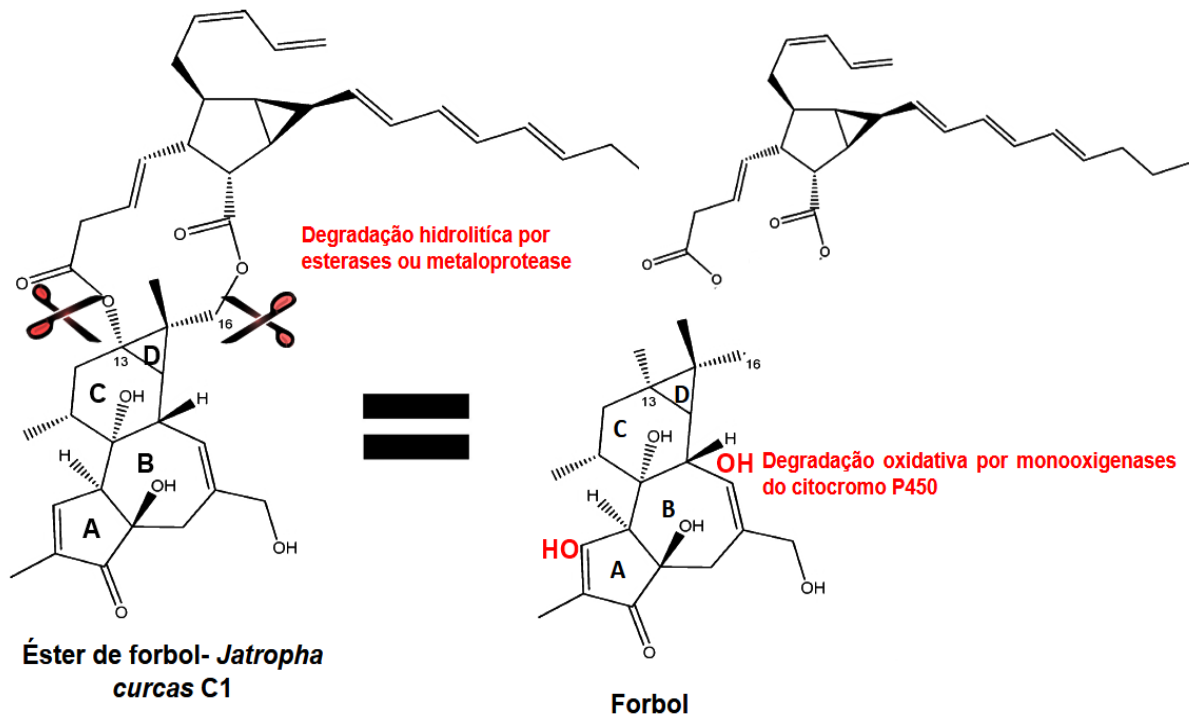


Figura 37. Modelo proposto para as etapas de degradação dos ésteres de forbol por *P. pulmonarius*.

6. Conclusões

Dados de expressão diferencial gênica *in silico*, analisado em diferentes tempos de cultivo, revelou que a molécula tóxica de éster de forbol forbol interfere no desenvolvimento inicial do basidiomiceto, inibindo funções celulares e vias metabólicas. Os dados obtidos também indicam que vias relacionadas ao metabolismo de lipídeo e carboidratos estão acionadas durante o crescimento de *P. pulmonarius* em ambos os tratamentos (T e NT), no entanto o metabolismo de proteínas parece se intensificar no cultivo em torta de pinhão-manso tóxica.

A análise de expressão diferencial de genes e do secretoma de *P. pulmonarius* forneceu dados importantes quanto aos genes e proteínas candidatas a degradação do diperteno éster de forbol, como por exemplo: hidrofobinas, *heat shock protein*- HSP, monooxigenases do citocromo P450, metaloproteases e esterases. Tanto os resultados de expressão diferencial de genes (*in silico* e RT-qPCR) indicaram que essas proteínas estão positivamente moduladas pelo basidiomiceto em cultivo tóxico.

De acordo com os dados obtidos, enzimas como esterases e metaloproteases estão envolvidas diretamente na degradação dos ésteres de forbol e essa degradação pode ser mediada ou intensificada pelas proteínas hidrofobinas. As monooxigenases do citocromo P450 podem agir na oxidação dos compostos gerados a partir da hidrólise da estrutura principal do éster de forbol. As hidrofobinas, juntamente com as *heat shock proteins*, podem também desempenhar um papel de proteção ao fungo contra as condições de *stress* inicial causada pela molécula tóxica.

Dessa forma, diferentes abordagens moleculares foram usadas para determinar quais genes e proteínas estão envolvidas na degradação dos ésteres de forbol pelo basidiomiceto *P. pulmonarius* EF88. Dados do transcrito via sequenciamento NGS, mostrou ser uma ferramenta eficiente na identificação de genes candidatos a degradação de ésteres de forbol *in silico*. Experimentos adicionais de validação desses genes por PCR em tempo real e análises proteômicas foram importantes para garantir a confiabilidade dos resultados e das hipóteses levantadas.

7. Conclusões finais da tese

Além da completa degradação dos ésteres de forbol o uso de microrganismos como agentes degradadores da molécula tóxica, permite melhorar o valor nutricional dos resíduos, aumentando o teor de proteínas disponíveis, reduzindo as frações de lignina (deslignificação) e contribuindo com bioativos como o beta-glucano e o ergosterol do micélio fúngico.

No entanto, apesar da biodestoxicação ser um método eficiente e específico para degradação dos ésteres de forbol, este processo ainda apresenta limitações como o tempo de cultivo e dificuldades de escalonamento. Abordagens transcritômicas e proteômicas foram usadas para gerar as primeiras informações relacionados ao comportamento de um micro-organismo em resposta ao cultivo em torta de pinhão-manso e a molécula tóxica de éster de forbol.

O presente trabalho fornece dados inéditos relacionados ao comportamento de um microrganismo cultivado no resíduo agroindustrial torta de pinhão-manso. Resultados do transcritoma e secretoma do basidiomiceto mostrou que *P. pulmonarius* responde de forma distinta quando cultivado em torta de pinhão-manso tóxica e atóxica, uma vez que os grupos gênicos e proteicos diferencialmente modulados são diferentes. Essas ferramentas foram importantes também para identificar enzimas esterases, uma vez que métodos de quantificação enzimática empregados nesse trabalho não foram eficientes. A quantificação laboratorial de proteases indicou alta atividade dessas enzimas, bem como os dados de expressão diferencial e proteoma.

A elucidação dos genes envolvidos em tais processos foi o primeiro passo em direção à triagem precisa de espécies biodestoxicadoras eficientes, e também para o melhoramento genético de cepas microbianas ou repositório de genes para construção de organismos recombinantes, permitindo que o tempo de degradação e a eficiência sejam otimizados.

8. Referencial da literatura

- A, C. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-&, 1967. ISSN 0022-5304.
- Abdelgadir, A. H.; Van Staden, J. Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L.(Euphorbiaceae): A review. **South African Journal of Botany**, v.88, p. 204–218, 2013.
- ACHTEN, W. et al. Jatropha bio-diesel production and use. **Biomass and bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1063-1084, 2008. ISSN 0961-9534.
- AMITAI, G. et al. Enhanced stereoselective hydrolysis of toxic organophosphates by directly evolved variants of mammalian serum paraoxonase. **The FEBS journal**, v. 273, n. 9, p. 1906-1919, 2006. ISSN 1742-4658.
- Andrews, G.L., Dean, R.A., Hawkrige, A.M., Muddiman, D.C., Improving proteome coverage on a LTQ-Orbitrap using design of experiments. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 22, p. 773–783, 2011.
- AREGHEORE, E.; BECKER, K.; MAKKAR, H. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 21, n. 1, p. 51-56, 2003. ISSN 1838-8388.
- ARUN, A.; EYINI, M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. **Bioresource technology**, v. 102, n. 17, p. 8063-8070, 2011. ISSN 0960-8524.
- Arshid, S., Tahir, M., Fontes, B., de Souza Montero, E.F., et al., High performance mass spectrometry based proteomics reveals enzyme and signaling pathway regulation in neutrophils during the early stage of surgical trauma. **Proteomics - Clin. Appl.** v. 11, 2017.
- BAYRY, J. et al. Hydrophobins—unique fungal proteins. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002700, 2012. ISSN 1553-7374.
- Barett, A. J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymology**, v. 244, p. 1–15, 1994.
- BELEWU, M. et al. Performance characteristics of goat fed Trichoderma treated feather meal-rice husk mixture. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 9, n. 2, p. 203-208, 2009. ISSN 0972-2963.
- BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 128-145, 2006. ISSN 0168-1656.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333-2345, 2012. ISSN 0049-6979.

BOSE, A.; KEHARIA, H. Phorbol ester degradation in Jatropha seedcake using white rot fungi. **3 Biotech**, v. 4, n. 4, p. 447-450, 2014. ISSN 2190-572X.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. Catalytic Promiscuity in Biocatalysis: Using Old Enzymes to Form New Bonds and Follow New Pathways, **Angewandte Chemie e Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, 6032 –6040, 2004.

Castanera, R. et al. Transcriptional and Enzymatic Profiling of *Pleurotus ostreatus* Laccase Genes in Submerged and Solid-State Fermentation Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4037–4045, 2012.

Castanera, R. et al. Validation of Reference Genes for Transcriptional Analyses in *Pleurotus ostreatus* by Using Reverse Transcription-Quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 4120–4129, 2015.

CASTRO, A. Complexo Agroindustrial de Biodiesel no Brasil. **Competitividade das Cadeias Produtivas de Matérias-Primas. Brasília-DF. Embrapa Agroenergia**, 2010.

CHANG, A. et al. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_1, p. D588-D592, 2008. ISSN 1362-4962.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J. biol. Chem**, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947.

CHEN, L. et al. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. **PLoS one**, v. 11, n. 8, p. e0160336, 2016. ISSN 1932-6203.

Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., et al., MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Res**, 2018.

Crowell, A.M., Wall, M.J., Doucette, A. A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica chimica acta**, v.796, p.48-54, 2013.

DE BARROS, C. R. et al. The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 107-110, 2011. ISSN 1618-2863.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 12, p. 2090-2097, 2010. ISSN 1097-0010.

DIAZ, J. M. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006. ISSN 0141-0229.

DRUMOND, M. A. et al. Agronomic performance of different genotypes of physic nut in the semi-arid zone of Pernambuco state. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 44-47, 2010. ISSN 0103-8478.

DURAES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G. A.; ALVES, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **Plant Sci. Rev**, v. 2011, p. 179, 2012.

ESPINO-RAMMER, L. et al. Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. stimulate enzymatic hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 14, p. 4230-4238, 2013. ISSN 0099-2240.

FEOFILOVA, E.; MYSYAKINA, I. Lignin: Chemical structure, biodegradation, and practical application (a review). **Applied biochemistry and microbiology**, v. 52, n. 6, p. 573-581, 2016. ISSN 0003-6838.

Feldman, D. et al. Detoxification of 5-hydroxymethylfurfural by the *Pleurotus ostreatus* lignolytic enzymes aryl alcohol oxidase and dehydrogenase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 63, n. 8, p. 1-11, 2015.

Garrido-Bazan, V. et al. Effect of textile dyes on activity and differential regulation of laccase genes from *Pleurotus ostreatus* grown in submerged fermentation. **AMB Express**, v. 93, n.6, p1-9, 2016.

GIRVAN, H. M.; MUNRO, A. W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. **Current opinion in chemical biology**, v. 31, p. 136-145, 2016. ISSN 1367-5931.

GOEL, G. et al. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International journal of toxicology**, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007. ISSN 1091-5818.

GOGOI, R.; NIYOGI, U. K.; TYAGI, A. K. Reduction of phorbol ester content in jatropha cake using high energy gamma radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 305-309, 2014. ISSN 1687-8507.

GOMES, T. G. et al. Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2018. ISSN 0021-8561.

GRUNÉR, M. S. et al. Self-assembly of class II hydrophobins on polar surfaces. **Langmuir**, v. 28, n. 9, p. 4293-4300, 2012. ISSN 0743-7463.

GUEDES, R. E. et al. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: analysis with a central composite rotatable design. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 537-543, 2014. ISSN 0926-6690.

HAERNVALL, K. et al. A new arylesterase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* can hydrolyze ionic phthalic polyesters. **Journal of biotechnology**, v. 257, p. 70-77, 2017. ISSN 0168-1656.

HA, J. et al. Genome sequence of *Jatropha curcas* L., a non-edible biodiesel plant, provides a resource to improve seed-related traits. **Plant Biotechnology Journal**, pp. 1–14, 2018.

HALL, J. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002. ISSN 1460-2431.

Hawkrige, A.M., in: **Quant. Proteomics**, 2014.

HIDAYAT, C. et al. Enhancing indigenous lipase activity of germinated *Jatropha curcas* L. seeds for the enzymatic degradation of phorbol ester. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 71-76, 2014. ISSN 1878-8181.

HIROSUE, S. et al. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 407, n. 1, p. 118-123, 2011. ISSN 0006-291X.

HSU, K.-H. et al. Cytochrome P450 genes in medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea* TT Chang et WN Chou (higher Basidiomycetes) are strongly expressed during fruiting body formation. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 13, n. 6, 2011. ISSN 1521-9437.

IANIRI, G.; IDNURM, A.; CASTORIA, R. Transcriptomic responses of the basidiomycete yeast *Sporobolomyces* sp. to the mycotoxin patulin. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 210, 2016. ISSN 1471-2164.

ICHINOSE, H.; WARIISHI, H. High-level heterologous expression of fungal cytochrome P450s in *Escherichia coli*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 438, n. 2, p. 289-294, 2013. ISSN 0006-291X.

INSANU, M. et al. Rational use of *Jatropha curcas* L. in food and medicine: from toxicity problems to safe applications. **Phytochemistry reviews**, v. 12, n. 1, p. 107-119, 2013. ISSN 1568-7767.

JIA, Q. et al. Microbial-type terpene synthase genes occur widely in nonseed land plants, but not in seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 43, p. 12328-12333, 2016. ISSN 0027-8424.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, 2011. ISSN 0960-8524.

Kalagatur, N. K. et al. Application of Activated Carbon Derived from Seed Shells of *Jatropha curcas* for Decontamination of Zearalenone Mycotoxin. **Frontiers Pharmacology**, v. 8, 2017.

KASUYA, M. C. M. et al. Bio-detoxification of *jatropha* seed cake and its use in animal feed. In: (Ed.). **Biodiesel-Feedstocks, Production and Applications**: Intech, 2012.

Kalli, A., Smith, G.T., Sweredoski, M.J., Hess, S., Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. **J Proteome Res**, v. 12, p. 3071–3086, 2013.

Kim, D. H.; Soo Suk Lee, S. S. Origin of Rate-Acceleration in Ester Hydrolysis with Metalloprotease Mimics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 647-652, 2000.

KREGEL, K. C. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of applied physiology**, v. 92, n. 5, p. 2177-2186, 2002. ISSN 1522-1601.

KUBICEK, C. P. et al. Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. **BMC evolutionary biology**, v. 8, n. 1, p. 4, 2008. ISSN 1471-2148.

KULIKOVA, N. et al. Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: fundamental and applied aspects. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 47, n. 6, p. 565, 2011. ISSN 0003-6838.

KUMAR, A. et al. Irrigation Scheduling and Fertilization Improves Production Potential of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.): A Review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 6, n. 5, p. 1703-1716, 2017.

Kumar, A.; Tewari, S. K. Origin, distribution, Ethnobotany and Pharmacology of *Jatropha curcas*. **Research Journal of medicinal plant**, v. 9, n. 2, p. 48-59, 2015.

KUVSHINOV, D.; SISWANTO, A.; ZIMMERMAN, W. Microbubbles enhanced synthetic phorbol ester degradation by ozonolysis. **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical and Molecular Engineering**, v. 1, n. 1, 2014.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984. ISSN 1873-3468.

LAVIOLA, B. G. et al. The importance of *Jatropha* for Brazil. In: (Ed.). **Jatropha, challenges for a new energy crop**: Springer, 2012. p.71-94.

Le Cao, K.A., Boitard, S., Besse, P., Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. **BMC Bioinformatics**, v.12,p. 253, 2011.

LUZ, J. M. R. D. et al. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1508-1515, 2012. ISSN 1517-8382.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1729-1735, 2008. ISSN 0960-8524.

MAKKAR, H.; ADERIBIGBE, A.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food chemistry**, v. 62, n. 2, p. 207-215, 1998. ISSN 0308-8146.

MAKKAR, H. et al. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997. ISSN 0021-8561.

MAKKAR, H. P.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **European journal of lipid science and technology**, v. 111, n. 8, p. 773-787, 2009. ISSN 1438-9312.

MARTIN, V. J.; MOHN, W. W. Genetic Investigation of the Catabolic Pathway for Degradation of Abietane Diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-

9. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3784-3793, 2000. ISSN 0021-9193.

MARTIN, V. J.; YU, Z.; MOHN, W. W. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. **Archives of microbiology**, v. 172, n. 3, p. 131-138, 1999. ISSN 0302-8933.

MARTINEZ-HERRERA, J. et al. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food chemistry**, v. 96, n. 1, p. 80-89, 2006. ISSN 0308-8146.

MAURYA, R. et al. A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 272-280, 2012. ISSN 0367-326X.

MENDES, A. P. D. A.; COSTA, R. C. D. Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. **BNDES Setorial, Rio de Janeiro**, n. 31, p. 253-279, 2010.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso. **Embrapa Agroenergia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009. ISSN 2177-4447.

Musa, S. F. et al. *Pleurotus sajor-caju* can be used to synthesize silver nanoparticles with antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 1197–1207, 2018.

MGBEAHURUIKE, A. C. et al. Evolutionary analysis of hydrophobin gene family in two wood-degrading basidiomycetes, *Phlebia brevispora* and *Heterobasidion annosum* sl. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 240, 2013. ISSN 1471-2148.

MORGAN, C.; WYNDHAM, R. Characterization of tdt genes for the degradation of tricyclic diterpenes by *Pseudomonas diterpeniphila* A19-6a. **Canadian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 49-59, 2002. ISSN 0008-4166.

MORI, T.; KONDO, R. Oxidation of chlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran by white-rot fungus, *Phlebia lindtneri*. **FEMS microbiology letters**, v. 216, n. 2, p. 223-227, 2002. ISSN 1574-6968.

MORRIS, V. K. et al. Recruitment of class I hydrophobins to the air: water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 15955-15963, 2011. ISSN 0021-9258.

NAJJAR, A. et al. Removal of Phorbol Esters Present in *Jatropha curcas* Kernel by Fungal Isolates. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 16, n. 5, 2014. ISSN 1560-8530.

NAKAO, M. et al. Degradation of *Jatropha curcas* phorbol esters derived from *Jatropha* oil cake and their tumor-promoting activity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 114, p. 357-364, 2015. ISSN 0147-6513.

NCUBE, T. et al. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state

fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 118-123, 2012. ISSN 0926-6690.

OGHENEKARO, A. O. et al. De novo transcriptomic assembly and profiling of *Rigidoporus microporus* during saprotrophic growth on rubber wood. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 234, 2016. ISSN 1471-2164.

OWEN, E.; SMITH, T.; MAKKAR, H. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries: A synthesis of an FAO e-conference. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 3-4, p. 211-226, 2012. ISSN 0377-8401.

PARK, Y.-J.; YOON, S.-J.; LEE, H.-B. A novel thermostable arylesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1: purification, characterization, and expression. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 24, p. 8086-8095, 2008. ISSN 0021-9193.

PEDDIREDDI, S. et al. Multiple hydrophobin genes in mushrooms. Antonio G. Pisabarro and Lucía Ramírez (eds.): VI Meeting on Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes (GCBB-VI). Pamplona: Universidad Pública de Navarra/Nafarroako Unibertsitate Publikoa, 2006., 2006, Universidad Pública de Navarra/Nafarroako Unibertsitate Publikoa.

PEDERSEN, N. R. et al. Efficient transesterification of sucrose catalysed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide. **FEBS Letters**, v. 519, p. 181-184, 2002.

PHASUKARRATCHAI, N.; TONTAYAKOM, V.; TONGCUMPOU, C. Reduction of phorbol esters in *Jatropha curcas* L. pressed meal by surfactant solutions extraction. **Biomass and bioenergy**, v. 45, p. 48-56, 2012. ISSN 0961-9534.

PHENGNUAM, T.; SUNTORNSUK, W. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 2, p. 168-172, 2013. ISSN 1389-1723.

PLETT, J. M. et al. Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 3, p. 199-209, 2012. ISSN 1087-1845.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Rev. Virtual Quim**, v. 9, p. 317-369, 2017.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, vol. 62, n. 3, 1998.

Rappsilber, J., Mann, M., Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature protocols**, n.2, v.8, p.1896, 2007.

Rawlings, N.D.; Barret, A. J.; Bateman A. Asparagine peptide lyases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p.38321–38328, 2011.

RIBITSCH, D. et al. Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3586-3592, 2015. ISSN 0099-2240.

RODRIGUES, F. V.; RONDINA, D. Alternativas de uso de subprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de ruminantes: glicerina bruta. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 91-99, 2013. ISSN 1981-5484.

SADAF, A.; KHARE, S. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource technology**, v. 153, p. 126-130, 2014. ISSN 0960-8524.

SILVA E SILVA, F. D. D.; GRASEL, D.; MERTENS, F. Participação da agricultura familiar no Programa Nacional de Biodiesel. **Revista de Política Agrícola**, v. 26, n. 1, p. 65-80, 2017. ISSN 2317-224X.

Silva, R. R. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2017.

SINGH, M. P. et al. Fermentative production of self-toxic fungal secondary metabolites. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 335-340, 2010. ISSN 1367-5435.

SMITH, D. J.; MARTIN, V. J.; MOHN, W. W. A cytochrome P450 involved in the metabolism of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3631-3639, 2004. ISSN 0021-9193.

SOOD, S. et al. Carboxylesterases: sources, characterization and broader applications. **Insights in Enzyme Research**, v. 1, n. 1, 2016. ISSN 2573-4466.

Soden, D. M.; Dobson, D. W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, p. 1755–1763, 2001.

SUZUKI, H. et al. Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnos*a and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 444, 2012. ISSN 1471-2164.

TAKAHASHI, T. et al. The fungal hydrophobin RolA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1780-1796, 2005. ISSN 1365-2958.

SCULLY, E. D. Proteomic Analysis of *Fusarium solani* Isolated from the Asian Longhorned Beetle, *Anoplophora glabripennis*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

TANAKA, T. et al. Analysis of the ionic interaction between the hydrophobin RodA and two cutinases of *Aspergillus nidulans* obtained via an *Aspergillus oryzae* expression system. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2343-2356, 2017. ISSN 0175-7598.

TANAKA, T. et al. Involvement of hydrophobic amino acid residues in C7–C8 loop of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA in hydrophobic interaction between RolA and a polyester. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 78, n. 10, p. 1693-1699, 2014. ISSN 0916-8451.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 3, p. 297-304, 2006. ISSN 1369-5266.

URLACHER, V. B.; GIRHARD, M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 26-36, 2012. ISSN 0167-7799.

VILANOVA, C. et al. Selecting microbial strains from pine tree resin: biotechnological applications from a terpene world. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100740, 2014. ISSN 1932-6203.

WALLACE, P. W. et al. PpEst is a novel PBAT degrading polyestrase identified by proteomic screening of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2291-2303, 2017. ISSN 0175-7598.

WANG, L. et al. Mining bacterial genomes for novel arylesterase activity. **Microbial biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 677-690, 2010. ISSN 1751-7915.

WANG, P. et al. Display of fungal hydrophobin on the *Pichia pastoris* cell surface and its influence on *Candida antarctica* lipase B. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5883-5895, 2016. ISSN 0175-7598.

WÖSTEN, H. A.; SCHOLTMEIJER, K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 4, p. 1587-1597, 2015. ISSN 0175-7598.

XIAO, J. et al. Evaluation of detoxification methods on toxic and antinutritional composition and nutritional quality of proteins in *Jatropha curcas* meal. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4040-4044, 2011. ISSN 0021-8561.

YAMAGUCHI, M. et al. Quantification of the mycelial mass of the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* by real-time PCR. **Bull FFPRI**, v. 8, p. 133-141, 2009

ZAJC, J. et al. Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 617, 2013. ISSN 1471-2164.

ZERBE, P. et al. Diterpene synthases of the biosynthetic system of medicinally active diterpenoids in *Marrubium vulgare*. **The Plant Journal**, v. 79, n. 6, p. 914-927, 2014. ISSN 1365-313X.

ZHANG, M. et al. Rapid Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake by Hydrogen Peroxide Oxidation and Acute Toxicity Evaluation of Detoxified Product. **Agricultural Research**, v. 3, n. 4, p. 302-307, 2014. ISSN 2249-720X.

Zorn, H. et al. The secretome of *Pleurotus sapidus*. **Proteomics**, v. 5, p. 4832-4838, 2005.

8. Anexo 1: Propriedade intelectual

Pôster premiado no Simpósio de Biologia Molecular 2018



Expressão diferencial de genes em *Pleurotus pulmonarius* associados a degradação enzimática e destoxificação da torta de pinhão-manso

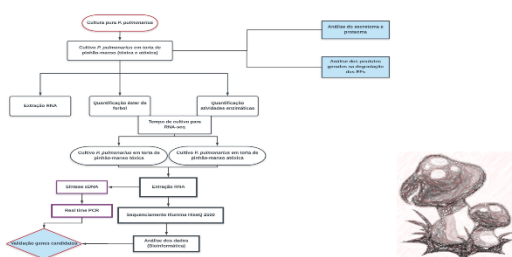
Taísa Godoy Gomes, Gabriel Sergio Costa Alves, Fernando Fonseca; Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi, Marcos Mota do Carmo Costa, Simone Mendonça, Félix Gonçalves de Siqueira, Robert Neil Gerard Miller

Introdução

Jatropha curcas (pinhão-manso) é uma planta oleaginosa promissora para produção de biodiesel devido ao alto rendimento de óleo pela semente e adaptação a diversos tipos de solos e fatores ambientais. O resíduo gerado após a extração mecânica do óleo, chamado de torta, tem em sua constituição fibras lignocelulósicas, proteínas (46-63%), lipídeos, carboidratos solúveis e minerais. A composição da torta de pinhão-manso torna este co-produto um potencial candidato para ser usado como suplementação animal e adubo orgânico. Dentre estas possibilidades, seu uso como insumo para ração animal é a mais atrativa; no entanto, faz-se necessária a inativação de compostos tóxicos. Os ésteres de forbol (EFs) são os principais componentes tóxicos neste co-produto, cujos efeitos biológicos em animais dependem da estrutura molecular, e podem induzir respostas inflamatórias agudas e a formação de tumores. No cenário de bio-destoxificação, *Pleurotus pulmonarius* degrada com eficiência esse composto tóxico e produz cogumelos comercialmente viáveis. Neste contexto, este projeto pretende identificar genes envolvidos no processo de destoxificação a fim de compreender e estabelecer o mecanismo de degradação do éster de forbol encontrados em tortas de pinhão-manso.

Metodologia

Figura 1. Fluxograma resumido da metodologia empregada no trabalho.



Resultado e Conclusão

Figura 5. Valores de M dos genes de referência obtidos pelo software NormFinder.

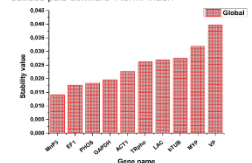


Figura 6. Valores de M dos genes de referência obtidos pelo software GeNorm. Linha vermelha indica a baseline.

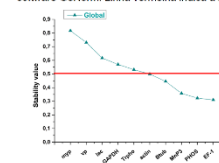


Figura 6. Níveis de expressão relativa dos genes que codificam para hidrofobinas que não proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento não tóxico e tóxico.

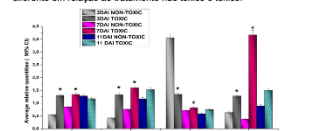
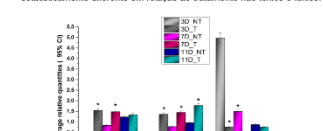


Figura 7. Níveis de expressão relativa dos genes que codificam para lipase, metaloprotease e anelastase, proteínas candidatas a degradação dos ésteres de forbol da torta de pinhão-manso. * Modulação estatisticamente diferente em relação ao tratamento não tóxico e tóxico.



Resultado e Conclusão

Figura 2. Degradação dos ésteres de forbol ao longo de 30 dias de cultivo de *Pleurotus pulmonarius* em torta de pinhão-manso. Valores abaixo da linha vermelha são considerados atóxicos.

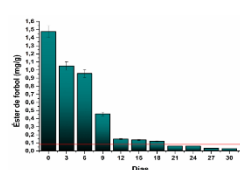
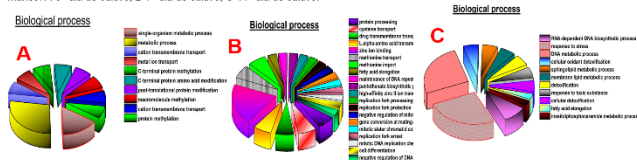


Figura 3. Heatmap dos genes diferencialmente expressos em *P. pulmonarius* durante 11 dias de cultivo em torta de pinhão-manso. A expressão gênica diferencial após o cultivo em torta tóxica foi relativo ao cultivo em torta atóxica.



Figura 4. Anotação GO relacionados a processo biológico identificados no cultivo de *Pleurotus pulmonarius* em torta de pinhão-manso. A-3^o dia de cultivo; B-7^o dia de cultivo; C-11^o dia de cultivo.



Apoio Financeiro



Referências Bibliográficas

- Mendonça, S.; Laviola, B.G. Uso potencial e toxicidade da torta de pinhão-manso. Embrapa agroenergia Comunicado técnico, Brasília-DF, 2009.
- Makkar, H.P.S.; Becker, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. European journal of lipid science and technology, v. 111, p.773-787, 2009.
- Gomes, T. G.; Hadi, S. I.I.A.; Alves, G.S. C.; Mendonça, S.; DE Siqueira, F.G.; Miller, R. N. G. Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018.

Expressão diferencial de genes em *Pleurotus pulmonarius* associados a degradação enzimática e destoxificação da torta de pinhão-manso

Táisa Godoy Gomes¹, Gabriel Sergio Costa Alves², Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi³, Marcos Mota do Carmo Costa⁴, Simone Mendonça⁵, Robert Neil Gerard Miller⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Resumo

Pinhão-manso (*Jatropha curcas*) é uma oleaginosa promissora para produção de biodiesel. A composição do coproduto gerado após a extração do óleo, chamado de torta, o torna um potencial candidato para ser usado na suplementação animal. No entanto, para tais fins se faz necessário a inativação de compostos tóxicos presentes nesse resíduo, como os ésteres de forbol (EFs). Os EF são diterpenos que podem induzir respostas inflamatórias agudas e a formação de tumores em animais. No cenário de biodestoxificação, o basidiomiceto *P. pulmonarius* degrada com eficiência esse composto e ainda produz cogumelos comercialmente viáveis. Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo identificar genes envolvidos nesse processo de biodestoxificação, por meio de sequenciamento paralelo massivo do transcrito de *P. pulmonarius* via Illumina HiSeq 2500. O transcriptoma do basidiomiceto foi analisado em três momentos distintos e em torta de pinhão-manso com presença (bioensaio T) e ausência de EFs (bioensaio NT). Os pontos escolhidos (3, 7 e 11 dias) foram baseados nos resultados da curva de degradação dos EFs ao longo de 30 dias de cultivo sólido. O transcriptoma do fungo foi montado usando o software EvidentialGene e assim mapeados um total de 23297 genes. Foram identificados 351 genes diferencialmente expressos (DEGs) no cultivo do basidiomiceto em torta de pinhão-manso tóxica, dos quais 234 estavam superexpressos e 117 reprimidos. Genes que codificam para proteínas como citocromo P450, hidrofobinas e *heat shock* foram regulados positivamente no tratamento T, em todos os dias avaliados. Além disso, as funções dos genes anotados foram classificadas pelas análises de *gene ontology* (GO). As análises de expressão diferencial de genes obtidos nesse trabalho fornecem os primeiros dados sobre os possíveis mecanismos envolvidos no processo de biodegradação, e podem ser usados para elucidar as vias metabólicas e principais proteínas envolvidos nesse bioprocessos.

Palavras chaves: *Jatropha curcas*, transcriptoma, NGS, Pré-tratamento biológico, Macrofungos.

¹ Biotecnologista, Doutoranda em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, taisa.gomes@colaborador.embrapa.br

² Biotecnologista, Pós Doutor, Universidade de Brasília, gscalves@gmail.com

³ Biotecnologista, Doutorando em Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, samed.ibrahim@colaborador.embrapa.br

⁴ Matemático, Analista Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, marcos.costa@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, Pesquisadora Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁶ Biólogo, Professor Associado I, Universidade de Brasília, robertmiller@unb.br

⁷ Biólogo, Pesquisador Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

LIGNOCELLULOLYTIC ENZYME ACTIVITIES IN WHITE ROT BASIDIOMYCETES CULTIVATED IN BIODIESEL INDUSTRY WASTES AS CARBON SOURCE

Taísa Godoy Gomes¹, Clemente Soares Batista Neto¹, Sámed Hadi², Gabriel Sergio Costa Alves¹, Simone Mendonça³, Félix Gonçalves de Siqueira³, Robert Neil Gerard Miller¹

¹Universidade de Brasília; ²Universidade Federal de Minas Gerais; ³Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

*e-mail: felix.siqueira@embrapa.br / robertmiller@unb.br

Cake material resulting from the extraction of oil (biodiesel sources) from *Jatropha curcas* seeds or cotton (*Gossypium hirsutum*) contain toxic or antinutritional compounds that limit their use in animal feed. *Jatropha curcas* is a promising oleaginous plant for biodiesel production due to the high oil yield from seeds and adaptability to different soil types and environmental factors. The residue (cake) generated after mechanical oil extraction consists of lignocellulosic fibers, proteins (46-63%), lipids, soluble carbohydrates and minerals. The composition of *Jatropha curcas* cake or cotton seed cake makes this co-product a potential candidate for use as an animal feed supplement (after detoxification process) or feedstock for second generation ethanol production. Two white-rot basidiomycete fungi, coded as strains EF-88 and CC-400, were inoculated onto 100 g of *Jatropha curcas* cake and cotton seed cake, respectively, and cultivated during 30 days. This project aims to identify the enzymes present following growth of these cultures. For the strain EF-88 grown on *Jatropha curcas* cake media, numerous lignocellulolytic enzymes were quantified after 72 hours growth: Laccase 1061.72 ± 53.08 U/mL; MnP 26.9 ± 1.34 U/mL; Protease 1318.75 ± 65.93 ; Xylanase 3.99 ± 0.11 ; FPase 0.781 ± 0.03 e CMCase 0.150 ± 0.02 . All activities increased as a function of time, but decreased on the 27th and 30th days. Cultivation of strain CC-400 in cotton seed cake media also showed enzyme activity after 72 hours growth: MnP 66.46 ± 3.69 U/mL; Protease 943.08 ± 55.65 ; Xylanase 5.29 ± 0.11 ; FPase 0.017 ± 0.01 U/mL and CMCase 0.79 ± 0.01 U/mL. On the 6th day, activity of protease and CMCase was reduced, 701.06 ± 32.61 U/mL and 0.24 ± 0.005 U/mL, respectively, but xylanase activity showed an increase of 13.15 ± 0.05 U/mL. The enzymatic activities remained stable until the 30th day, with the exception of MnP and CMCase, in which by the 27th day did not display any remaining activities.

