

**ARTIGO EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÕES DO DNA E DO METABÓLITO SECUNDÁRIO PRODUZIDO PELO FUNGO *TRICHODERMA REESEI* NAS FASES DE CRESCIMENTO.**

EVALUATION OF THE DNA AND SECONDARY METABOLITE PRODUCTION BY THE FUNGUS *TRICHODERMA REESEI* DURING ITS GROWTH PHASES.

Deborah Kohn Damiano (Damiano,DK)*

Gabriela Mendes de Souza (Souza, GM)*

Erik Cendel Saenz Tejada (Saenz,EC)*

Charlotte Cesty Borda de Saenz (Borda, CC^a)*

RESUMO

O gênero *Trichoderma* desperta grande interesse na área agrícola e na medicina por produzir compostos bioativos aplicados na indústria. O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de metabólitos secundários nas fases de crescimento do *Trichoderma reesei*, a atividade antimicrobiana e avaliar a extração de DNA *in house* de *T. reesei*, através do protocolo de *Salting out*. Foi realizada uma cultura com 10⁵ esporos em meio Sabouraud, monitorado por 7 dias. Para o processo da produção de metabólitos, o metabólito secundário foi avaliado no espectrofotômetro entre os comprimentos de onda de 200nm a 600nm e a função antimicrobiana foi avaliada por teste de ágar difusão. A síntese do metabólito secundário foi avaliada pela produção de um exsudato amarelo. Os antibiogramas apresentaram halo de inibição nos tratamentos 30°C e 37°C+CO₂ para *Proteus* spp. e o tratamento 37°C para *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *Salmonella* spp. O tratamento TA não apresentou halo de inibição para as bactérias testadas. Os resultados denotaram a obtenção de DNAg de boa qualidade nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, apresentando boa integridade, concentração e alta pureza. Os tratamentos T5, T6 e T7, que utilizaram esporos para extração, não apresentaram resultados satisfatórios.

Palavras-chave: *Trichoderma reesei*; DNA; metabólito secundário; extração; crescimento.

* Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU; Av. Santo Amaro, 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, SP, Brasil. CEP: 04505-002.

SUMMARY

The genus *Trichoderma* is of great interest in agriculture and medicine for producing bioactive compounds applied in the industry. The objective of this paper was to evaluate the production of secondary metabolites in the different growth stages of *Trichoderma reesei*, its antimicrobial activity and evaluate in house DNA extraction of *T. reesei*, using the Salting out protocol. A culture with 10^5 spores was cultivated in Sabouraud broth, and it was monitored for 7 days. For the process of metabolites production, the secondary metabolite was evaluated in spectrophotometer between the wavelength of 200nm to 600nm. The antimicrobial function was assessed by agar diffusion test. The synthesis of the secondary metabolite production was assessed by the production of a yellow exudate. The antibiotic susceptibility presented an inhibition zone in treatments 30°C and 37°C + CO₂ for *Proteus* spp. and treatment 37°C for *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *Salmonella* spp. The RT treatment presented no inhibition zone for the tested bacteria. Results exhibit obtainment of good quality genomic DNA in treatments T1, T2, T3 and T4, presenting satisfactory integrity, concentration and high purity. T5, T6 and T7 treatments, that used for spores for the DNA extraction, presented no satisfactory results.

Keywords: *Trichoderma reesei*; DNA; secondary metabolite; extraction; growth.

INTRODUÇÃO

Os fungos possuem uma grande capacidade para sintetizar e produzir diversas e variadas moléculas orgânicas de relativo baixo peso molecular, com atividades biológicas interessantes. Atualmente a maior parte dos grupos de pesquisa que trabalham com produtos naturais produzidos por fungos, se concentra em suas aplicações farmacêuticas, em suas funções como micotoxinas e suas funções ecológicas¹.

Técnicas de Biologia Molecular permitem que várias espécies sejam convertidas em eficientes produtoras industriais de enzimas e, atualmente, pesquisas sobre os genes de *Trichoderma* vêm sendo conduzidas para a geração de plantas transgênicas mais resistentes a fungos fitopatogênicos, ainda controversa. O complexo celulase do *Trichoderma reesei* consiste em várias atividades enzimáticas, as quais juntamente fazem a hidrólise completa de celulose em glicose^{2,3}.

As espécies do gênero *Trichoderma* podem ser encontradas no solo, em materiais vegetais e substratos em decomposição. São organismos frequentemente presentes na microflora de solos de uma grande variedade de "habitats", devido à sua diversa capacidade metabólica e à sua competitividade na natureza, por possuírem a capacidade de atacar outros fungos⁴.

Este gênero é constituído por espécies de fungos filamentosos, mesofílicos,

apresentam hifas septadas, ramificadas de 5 a 10 µm de diâmetro, polinucleadas, de núcleo haplóide, desenvolvendo rapidamente colônias brancas e almofadas verdes ou amarelas de filamentos de esporulação. A produção dos esporos acontece no extremo da fiálide e se agrupam em pequenas massas⁵.

O gênero *Trichoderma* possui uma grande variedade de espécies, dentre elas: *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *T. atroviridis*, entre outras. No entanto, a de maior interesse econômico é a *Trichoderma reesei*, por ser primordial na produção de celulases e hemicelulases, além de ser utilizado para expressão heteróloga de proteínas⁶.

Espécies de *Trichoderma*, como o *Trichoderma reesei*, têm a capacidade de produzir substâncias denominadas "metabólitos secundários". Seu efeito varia entre espécies e também entre isolados da mesma espécie⁷.

A produção de metabólitos por *Trichoderma* sp. foi primeiramente relatada em 1934 por Weindling. Por produzir antibióticos com efeitos variados sobre as bactérias e fungos, as espécies de *Trichoderma* têm um grande interesse agrícola e também na medicina. Tais efeitos estão relacionados a atividades antifúngicas, antibacteriana, imunossupressores, inibidores de ATP e outros⁸.

Sabe-se que a diversidade dos metabólitos secundários está relacionada com seus mecanismos de sobrevivência devido à sua contínua competitividade por alimentos e espaço com outros fungos, bactérias e microorganismos parasitários. Por esta razão, muitos dos metabólitos secundários isolados a partir do cultivo de fungos são compostos que possuem atividades antibióticas ou antifúngicas. Estudos sobre metabólitos secundários produzidos por fungos vêm sendo conduzidos, com o foco no descobrimento de novas drogas com o potencial de combater microorganismos fitopatogênicos¹.

Os policetídeos de origem fúngica são uma grande classe de metabólitos secundários e apresentam uma grande diversidade estrutural entre os produtos naturais. A maior parte desses compostos é ativa em diferentes sistemas biológicos. Sendo assim, a pesquisa de policetídeos em microorganismos vem sendo considerada uma boa estratégia para estudos de substâncias bioativas⁹.

Por sua grande importância na biotecnologia, estudos sobre o *Trichoderma reesei* vem sendo conduzidos em diversos laboratórios por todo o mundo, devido a sua grande capacidade de produzir e secretar enzimas incluindo os compostos policetídeos^{10,11}.

Os policetônicos podem ser divididos em 3 classes: moléculas complexas ou reduzidas, sintetizadas por PKSs do tipo I; policetônicos aromáticos sintetizados por PKSs do tipo II, que possuem um sistema enzimático multifuncional e moléculas sintetizadas por PKSs do tipo III, formadas por uma superfamília de enzimas biossintéticas¹².

A maioria dos policetídeos é sintetizada por diferentes espécies de fungos, e devido a sua importância, novas pesquisas têm sido desencadeadas para obter metabólitos visan-

do à obtenção de outros compostos bioativos. A pesquisa por policetídeos em cepas fúngicas selvagens pode resultar em novas fontes para compostos de grande importância por suas atividades biológicas^{13, 14}.

Após a realização do sequenciamento genômico do fungo *Trichoderma reesei*, encontrou-se um grande número de genes sem função determinada. Portanto, é de extrema importância a obtenção de DNA de boa qualidade e pureza para o estudo da função destes genes¹⁵.

O presente trabalho tem como objetivo analisar a curva de crescimento do *Trichoderma reesei*, verificar a eficiência do protocolo de *Salting out* para extração do DNA genômico do fungo com alto rendimento e baixo custo com o intuito de manipulação gênica, e avaliar a atividade do metabólito secundário produzido pelo *Trichoderma reesei* durante as fases de crescimento em condições de estresse.

METODOLOGIA

Micro-organismo

Durante o desenvolvimento do trabalho foi utilizado a cepa de *Trichoderma reesei* ATCC 13631 produtores de celulose e sensível a choque térmico. Após o cultivo foi feita uma análise do ciclo de crescimento, extração de metabólito secundário para teste de função anti-microbiana e extração de DNA genômico.

Cultivo das células

Para a análise da curva de crescimento e para a extração de DNA genômico foi utilizada a cultura do fungo *Trichoderma reesei*, inoculado em meio Sabouraud a 30°C durante 6 dias, com observação do desenvolvimento diariamente neste período. A cepa foi pelletizada em eppendorfs e armazenadas a - 4°C. Adicionalmente, para a extração de DNA genômico, foi feito o cultivo em meio líquido da seguinte maneira: inoculação de esporos em 50ml de meio Saboraud líquido, preparado conforme as instruções indicadas no rótulo e após 5 dias de cultivo, duas técnicas foram utilizadas para utilização do material:

- a. Centrifugação de 3ml por 3 minutos a 10000 rpm para pelletização.
- b. Extração do micélio com o auxílio de uma espátula e congelamento do material por 24 horas. O micélio foi então macerado para assim dar continuidade ao protocolo.

Para a análise da produção de metabólitos secundários, o fungo foi inoculado em meio Sabouraud a temperatura ambiente, 30°C, 37°C e a 37°C+CO₂ 5%. As placas foram armazenadas com ph entre 5,2 á 5,9 uma vez que esse ph é o mais adequado para o crescimento do *Trichoderma reesei*.

Avaliação da produção de metabólito secundário

Para a avaliação do metabólito secundário produzido por meio da produção de um exudato amarelo presente nas placas. Este foi observado e extraído diariamente durante o período de sete dias. A extração foi feita com 4ml de Álcool Isopropílico, homogeneização e coleta com uma pipeta, o material extraído foi armazenado em tubo Falcon. Em seguida, foi realizada varredura em espectrofotometria entre 200nm a 600nm.

Teste anti-microbiano

Para testar se o metabólito secundário produzido pelo *Trichoderma reesei* possui função anti-microbiana, foram semeadas as bactérias *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis* em ágar TSA, em placas separadas. Em seguida, foram colocados pedaços de canudo que serviram como suporte para o metabólito secundário ser depositado. O número de canudos colocados em cada placa foi correnspnente ao número de metabólitos secundários coletados dos ambientes sendo testados (temperatura ambiente, 30°C, 37° e 37°+CO₂ 5%). As bactérias foram escolhidas em função de sua classificação em Gram Positiva e Gram Negativa, sendo que 50% são Gram Positivas e 50% Gram Negativa.

Métodos de extração de DNA

Para a extração do DNA genômico de *Trichoderma reesei* foram utilizados os seguintes protocolos: Extração com SDS 10% e com adição de Proteínase K. Foram testados 7 tratamentos, sendo os tratamentos T1, T2, T3 e T4 a partir de micélio e os tratamentos T5, T6 e T7, a partir de esporos, com variações na quantidade de SDS 10%, NaCl, Etanol absoluto e tempo e temperatura de incubação em banho maria. Os tratamentos foram os seguintes:

- T1: 30ul de SDS%, 100ul de NaCl, 1000ul de Etanol absoluto e banho maria por 30 minutos a 55°C.
- T2: 35ul de SDS%, 150ul de NaCl, 1500ul de Etanol absoluto e banho maria por 30 minutos a 55°C.
- T3: 30ul de SDS%, 100ul de NaCl, 1000ul de Etanol absoluto e banho maria por 60 minutos a 60°C.
- T4: 35ul de SDS%, 150ul de NaCl, 1500ul de Etanol absoluto e banho maria por 60 minutos a 60°C.
- T5: 20ul de SDS%, 100ul de NaCl, 1000ul de Etanol absoluto e banho maria por 20 minutos a 55°C.
- T6: 25ul de SDS%, 150ul de NaCl, 1500ul de Etanol absoluto e banho maria por 20 minutos a 55°C.
- T7: 35ul de SDS%, 150ul de NaCl, 750ul de Isopropanol e banho maria por 20 minutos a 55°C.

Eletroforese

Para avaliação do DNA genômico extraído, foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando brometo de etídio como intercalante de DNA para visualização em luz ultravioleta.

Na preparação da amostra de DNA foi utilizado como corante o tampão de amostra contendo azul de bromofenol.

Quantificação

A quantificação do DNA obtido foi feita em espectrofotômetro, medindo a absorbância em 260nm e 280nm. Em seguida, foi feito o cálculo de concentração: $260 \times 100 \times 50$, onde 100 é o fator de diluição e 50 pois 1U de absorbância a 260 nm corresponde a uma solução de DNA com a concentração de 50 µg/mL.

Este estudo foi realizado no laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar o ciclo de crescimento do *T. reesei* foi observado que a produção do micélio iniciou-se a partir do segundo dia em todos os tratamentos com diâmetro de aproximadamente 12mm, e houve um crescimento acelerado a 37°C em relação aos outros tratamentos com um diâmetro micelial de 59,3mm no terceiro dia. A produção de metabólito secundário foi avaliada pela síntese de um exsudato amarelo que se iniciou ao terceiro dia nas placas armazenada em todas as temperaturas, exceto em TA. As placas incubadas a 30°C e 37°C+CO₂, apresentaram produção de metabólito secundário com intensidade moderada, enquanto as placas incubadas a 37°C, apresentaram produção de metabólito secundário intenso. O tratamento TA iniciou a produção do metabólito secundário a partir do quinto dia, denotando um pico de absorção a 270nm. O tratamento 30°C apresentou picos de 270nm e 380nm, o 37°C apresentou picos a 270nm, 360nm, 380nm e 400nm e o 37°C+CO₂ apresentou picos a 270nm, 360nm e 380nm indicando a presença de metabólitos secundários (Figura 1).

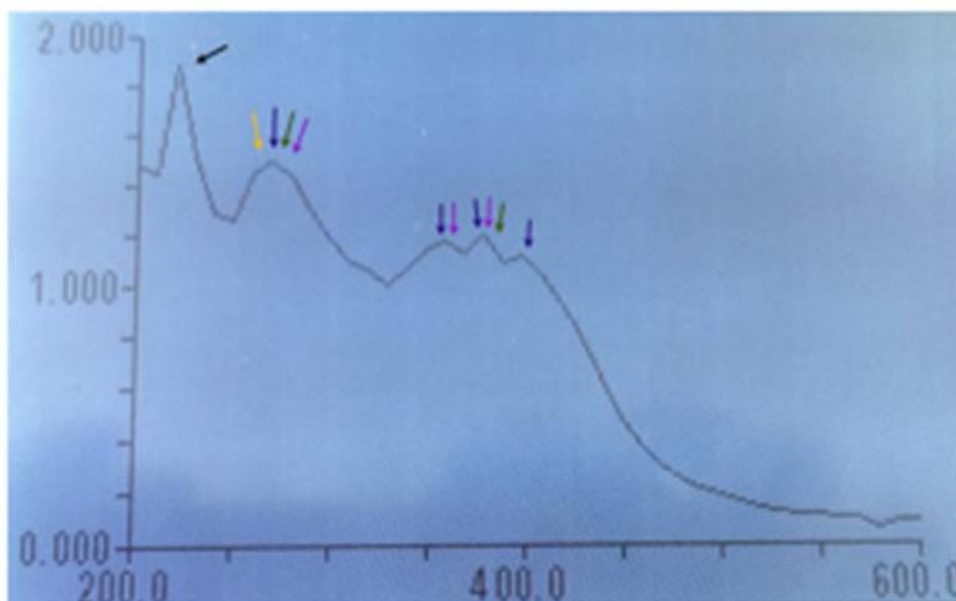


Figura 1. Avaliação em espectrofotômetro dos metabólitos secundários extraídos das quatro diferentes temperaturas (Temperatura Ambiente, 30°C, 37°C e 37°C+CO₂).

→ Controle → Temperatura ambiente → 30°C → 37°C → 37°C+CO₂

Após a realização do teste ágar difusão foi observado um halo de inibição pelos tratamentos 30°C e 37°C+CO₂ para a bactéria *Proteus* spp de diâmetro de 8mm e 10mm, respectivamente, e o tratamento 37°C para as bactérias *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella* spp de diâmetros de 9mm, 8mm e 8mm, respectivamente, diferente do tratamento TA que não apresentou halo de inibição para nenhuma bactéria testada (Figura 2).

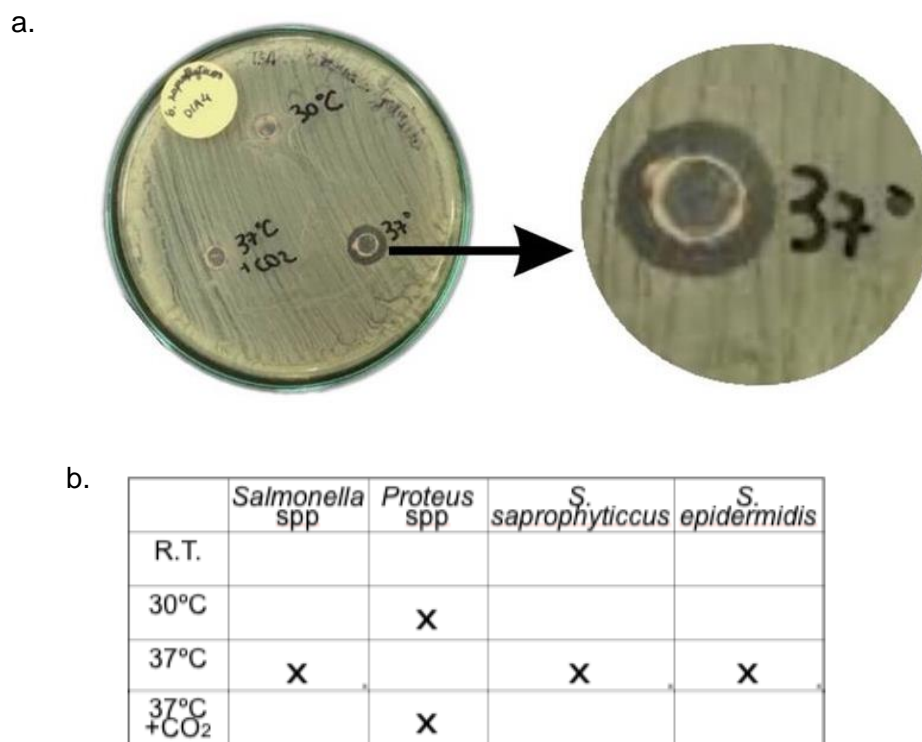


Figura 2. Avaliação da atividade antimicrobiana do metabólito secundário a. Halo de inibição produzido no teste ágar-difusão b. Tratamentos que apresentaram halo de inibição para as bactérias testadas.

Para avaliar o material genômico do fungo produtor de composto bioativo foi extraído o DNA para estudos genômicos posteriores.

Os tratamentos T1, T2, T3 e T4 foram utilizados para extração de DNA genômico de micélio extraído de meio líquido, os tratamentos T5, T6 e T7 foram realizados a partir de esporos. Ao calcular a concentração dos tratamentos realizados a partir de micélio, obteve-se concentrações de 745µg/ml, 730µg/ml, 490µg/ml e 645µg/ml, respectivamente. Quanto a pureza do DNA obtido, todas se mostraram próximas a 1,8. Todos os tratamentos a partir de micélio se mostraram eficientes pelos resultados obtidos na eletroforese em gel de agarose a 1%, com presença de bandas visíveis. Os tratamentos T5, T6 e T7 não apresentaram resultados satisfatórios. Conclui-se que foram obtidos resultados favoráveis a partir do uso dos protocolos T1, T2, T3 e T4 testados, com presença de banda visível e alta concentração e pureza (Figura 3).

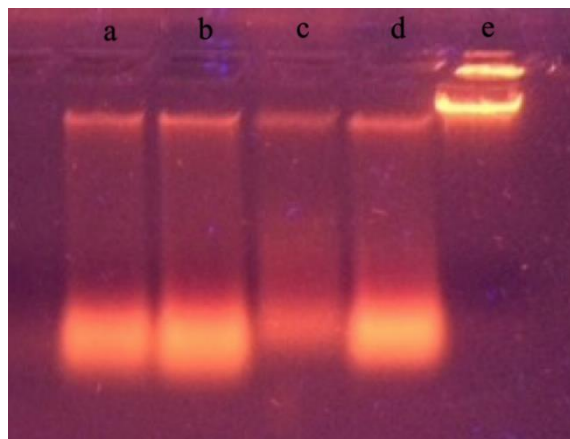


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Canaleta a. Tratamento 1; canaleta b. Tratamento 2; canaleta c. Tratamento 3; canaleta d. Tratamento 4; canaleta e. DNA lambda (controle).

CONCLUSÃO

Através dos resultados proporcionados pelo teste ágar difusão, conclui-se que o metabólito secundário extraído possui atividade antimicrobiana, por ter apresentado halos de inibição para as bactérias *Proteus* spp (30°C e 37°C+CO₂), *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella* spp (37°C), enquanto o tratamento T.A. não apresentou halo de inibição. A partir destes resultados, juntamente com os resultados obtidos na leitura do espectrofotômetro, conclui-se que o exsudato amarelo encontrado nas placas armazenadas representa o pico a 270nm presente nos resultados de todas as temperaturas testadas.

O protocolo de *Salting out* é eficiente para extrair DNA genômico de *Trichoderma reesei*. Os protocolos T1, T2, T3 e T4 foram eficientes, apresentando bons resultados. Os protocolos T5, T6 e T7 não apresentaram resultados satisfatórios. Conclui-se então que a extração de DNA genômico de *Trichoderma reesei* gera melhores resultados quando feita a partir do micélio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gallardo GL. Aislamiento y determinación estructural de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en apicultura y agricultura obtenidos a partir de cultivos de hongos. [Tese] Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2009.

2. Lorito MS, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 95(14), 7860-5.
3. Carter GL, Allison D, Rey MW, Dunn-Coleman NS. Chromosomal and genetic analysis of the electrophoretic karyotype of *Trichoderma reesei*: mapping of the cellulase and xy-lanase genes. *Mol Microbiol* 1992; 6(15), 2167–74.
4. Samuels GJ. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycology Research* 1996; 100(8), 923-35.
5. Andrade ST, Venâncio SB. Influência na temperatura do crescimento fúngico produtor de composto bioativo *Trichoderma reesei*. São Paulo: Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, 2013.
6. Silva RN. Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorin* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulasas (cbh1 e cbh2) em presença de celulose e soforose durante o antagonismo contra *Pythium ultimum*. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, 2008.
7. Martins-Corder MP, Melo IS. Antagonismo In Vitro de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. *Sci agric* 1998; 55(1), 1-7.
8. Adell CC. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. [Tese] São Paulo: Instituto de Biociência do Campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2004.
9. Pastre R, Marinho AMR, Filho ER, Souza AQL, Pereira JO. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. *Quím Nova* 2007; 30(8), 1867-71.
10. Beguin P. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu Rev of Microbiol* 1990; 44, 219-48.

11. Courtois S, Cappellano CM, Ball M, Francou FX, Normand P, Helynck G, Martinez A et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* 2003; 68(1), 49-55.
12. Hopwood DA, Sherman DH. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* 1990; 24, 37–66.
13. Hutchinson CR. Microbial polyketide synthesis: more and more prolific. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(7),3336-8.
14. Pastre R, Filho ER, Marinho AMR. Identificação de policetídeos por espécies de *Penicillium* usando LC/UV. *J Braz ChemSoc* 2005; 16(2) 280-3.
15. Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* 2008; 26(5) 553-6.