



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA B-ENDOGLUCANASE DE *Moniliophthora perniciosa* EM CÉLULAS DE *E. coli*

Myrelle Nascimento¹; Raquel Benevides²; Alison Borges³ e Cleide Santana⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: myrelle.nascimento1998@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alisonborgesvictor@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ssantanacleide@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Moniliophthora perniciosa*; b-Endoglucanase; Vassoura de Bruxa.

INTRODUÇÃO

A biomassa vegetal representa a maior fonte de energia renovável na natureza. (MAKHUVELE *et al.*, 2017). De acordo com Rungrattanakasine *et al.* (2018) a celulose tem sido considerada um bom candidato para a produção de biocombustíveis. Desta forma, o basidiomiceto hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.), provoca a degradação dos tecidos vegetais (biomassa) através de enzimas celulolíticas em todos os órgãos das plantas infectadas, sendo este o sintoma mais importante que o *M. Perniciosa* causa no cacau, já que ele é descrito como um excelente produtor de enzimas celulolíticas (Endoglucanase, Exoglucanase, Celobiose) (CEITA,2007). Várias endoglucanases de fungos têm sido isoladas, purificadas e caracterizadas para permitir a utilização da celulose (Lynd *et al.*, 2002). A produção de bioetanol vem progredindo por meio do desenvolvimento de novas tecnologias, porém ainda são necessárias pesquisas avançadas nesse campo para superar os desafios (MAKHUVELE *et al.*, 2017). Assim, estudos relacionados com a produção e aplicação dessas enzimas são de suma importância. Esse trabalho visa contribuir com o conhecimento relacionado à produção de forma recombinante de uma endoglucanase do fungo *M. perniciosa* a partir de células de *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ácidos ribonucléicos necessários para os estudos foram extraídos utilizando-se o protocolo do Reagente Trizol (Invitrogen®). O RNA extraído foi analisado qualitativamente pela técnica visualização em fotografia digital (KODAK EDAS 290®), após 30 min a 100 v e 98 mA de corrida eletroforética. A partir do RNA total extraído foi realizada síntese de cDNA empregando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase do kit promega.

Os *primers* para a enzima b-Endoglucanase foram desenhados de acordo com uma sequência de uma Glicosil Hidrolase 45- GH45. Seleccionada a partir do sequenciamento completo do Genoma de *Moniliophthora perniciosa*, fornecido pelo Professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica da UNICAMP.

A amplificação do cDNA foi feita por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). Como fita molde foi utilizada a primeira fita de cDNA e como iniciadores, o *primer* desenhado para o gene (como senso) e oligo-dT (Ancor Primer, anti-senso). A reação foi feita utilizando-se o kit Quiagen® Master Mix. O produto obtido a partir da reação de PCR foi purificado utilizando-se o protocolo com PEG e para verificar a qualidade da amostra a partir de eletroforese em gel de agarose utilizou-se cuba de eletroforese e fotodocumentador (KODAK EDAS 290®).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

De acordo com a figura 1 é possível verificar o crescimento micelial de *M. perniciosa* após 10 dias nos meios WY e CMC; foi constatado que o fungo cultivado em meio WY apresentou melhores resultados no quesito massa micelial. No trabalho de Donini, Bernardi, e Nascimento (2006) foram avaliados diferentes meios a base de farelos e o farelo de trigo (WY) com concentração de 20% proporcionou a maior massa miceliana e velocidade de crescimento indo de acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa onde foi utilizado 4% de farelo de trigo. Além disso, Dutra (2013) em seu trabalho constatou que *C. cubensis* quando cultivado em farelo de trigo e CMC, produziu as atividades de endoglucanase, 3,6 U/ml e 2,8 U/ml respectivamente. Os resultados de Dutra estão de acordo com os obtidos nessa pesquisa pois a atividade da endoglucanase no meio WY supera o meio CMC. Estes resultados deixam evidente a influência da composição do meio, na eficiência do processo de crescimento.

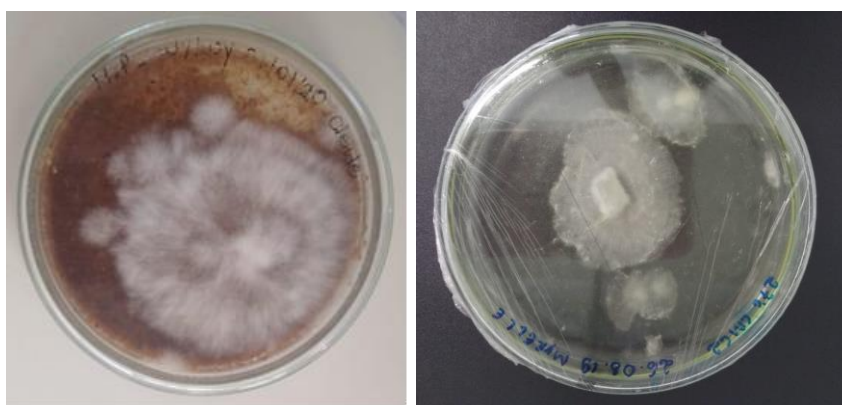


Figura 1: Imagem lado esquerdo *Moniliophthora perniciosa* cultivado em meio wy após 10 dias, imagem lado direito *M. perniciosa* cultivado em meio CMC após 10 dias.

Os *primers* utilizados para a enzima endoglucanase (Tabela 3) foram EndoG_464_Ndel F e EndoG_464_BamHI R com teor C/G de 45,5% e 54,5% respectivamente.

Tabela 3: Sequências de *Primers* de endoglucanases.

Primer	Sequência (5'-3')	T.M (°C)
	Negrito: sítios de restrição; vermelho: códon stop	
EndoG_464_Ndel_F	GGA ATC CAT ATG ATG CTC ACC AAA GCC GTA CTT	62,8
EndoG_464_BamHI R	GCG CGG ATC C TTA TC AGG CAA GCT CCT CAT AAG	64,5

O cultivo do fungo em meio WY após 10 dias e nas condições favoráveis apresentou resultados satisfatórios no processo de extração de RNA total para análise da indução da enzima endoglucanase, na figura 2 é possível observar os números 1 a 2 mostrando as bandas 28S, 18S do RNA respectivamente, indicando a integridade e qualidade das amostras extraídas; a integridade do RNA total foi demonstrada pela presença de bandas íntegras de RNAr de 28s e 18s (SILVA, 2018).

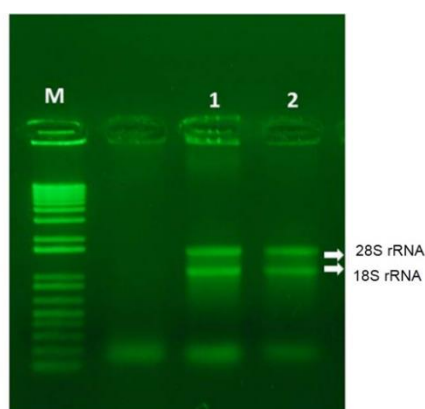


Figura 2: Gel referente a extração de RNA com fungo cultivado em meio WY.

Também foram feitas extrações de RNA (Figura 3) do fungo cultivado nos meios WY e CMC em diferentes condições (sem agitação e sob agitação e com período de crescimento de 08 e 10 dias respectivamente) o que possibilitou identificar os melhores resultados para cada condição, podemos ver que nos poços 01, 02 e 03 as bandas 28S e 18S estão nítidas mostrando que a metodologia aplicada teve bom resultado para o desenvolvimento da pesquisa. A amostra do poço 01 (fungo cultivado por 8 dias em meio WY sem agitação) foi escolhida para a próxima etapa de síntese de cDNA por conta de sua qualidade de amostra e por ter apresentado sempre bons resultados na amplificação.

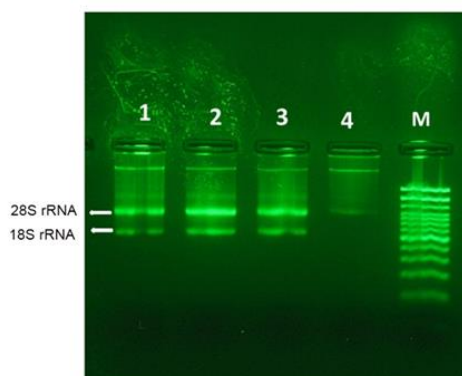


Figura 3: *Moniliophthora perniciosa* cultivado em meio WY e CMC, WY com 8 dias (1) e CMC com 8 dias (2) em estufa B.O.D a 28°C, sem agitação. WY com 10 dias sob agitação (3), CMC com 10 dias sob agitação (4).

A partir do cDNA e com o uso dos *primers* específicos que foram desenhados para o gene da Endoglucanase, na amplificação foi possível verificar aproximadamente 1500 pb (Figura 4). A purificação do produto de PCR ocorreu, e está sendo levado para sequenciamento que posteriormente será usado para desenhar os *primers*, que vão flanquear a sequência do gene de interesse permitindo a sua clonagem e expressão.

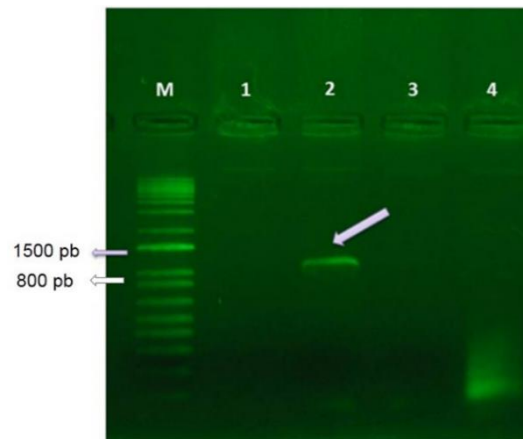


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% da amplificação de cDNA de endoglucanase em *M. perniciosa*. (M) Marcador de 1 kb Plus DNA Ladder. (2) *primer* EndoG_464_Ndel. Reação ocorreu em SYBER™ Green (ThermoFisherScientific) com TaqPlimerase e aditivos.

CONCLUSÕES

Através da análise de crescimento em meio WY e CMC, constatou-se que o fungo apresentou maior massa micelial no meio composto por farelo de trigo (WY). A extração em diferentes condições mostrou que WY e CMC com 8 dias, sem agitação e WY com 10 dias sob agitação obtiveram resultado favorável para extração de RNAm, já o CMC com 10 dias sob agitação as bandas não ficaram nítidas, demonstrando que a metodologia não é favorável para extração. Os resultados referentes a extração de RNAm em meio WY foi positivo para a expressão da enzima b-Endoglucanase pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, onde verificou-se a amplificação de um produto de PCR de aproximadamente 1500 pb, demonstrando que houve indução da enzima nessas condições. As próximas etapas serão clonar e expressar essa sequência purificada em células de *E. coli*.

REFERÊNCIAS

DONINI, Lorena Pastorini; BERNARDI, Eduardo; NASCIMENTO, José Soares do. Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. **Pesq. agropec. bras.**, [Brasília], v. 41, n. 6, p. 995-999, Jun. 2006. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/pab/v41n6/30866.pdf>>. Acesso em: 18 Jul. 2020.

DUTRA, Thiago Rodrigues. **Influência das fontes de carbono na indução de celulasas e hemicelulasas em *Chrysosporthe cubensis* cultivado em meio líquido**. 2013. 43 f. Dissertação

(Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013. Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.

SILVA, Raquel Aguiar da. **Caracterização molecular e estrutural de quitinases de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora**. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. Orientador: Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides

MAKHUVELE, Rhulani et al .Isolation of fungi from dung of wild herbivores for application in bioethanol production. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 48, n. 4, p. 648-655, Dec. 2017 .

RUNGRATTANAKASIN, Budsayachat et al . Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBiNU-1 in *Kluyveromyces lactis*. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 647-655, Sept. 2018.

CEITA, Geruza O. et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science*, v.173, n.2, p.106-107, ago. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945207001288>>