

Avaliação de enzimas hidrolíticas do fungo *Trichoderma harzianum* ALL 42 frente a diferentes fitopatógenos

Thiago Fernandes QUALHATO¹, Fabyano Alvares Cardoso LOPES¹, Andrei Stecca STEINDORFF¹, Cirano José ULHOA¹

¹ *Laboratório de Enzimologia, ICB, UFG, Goiânia-GO*

thiagonith@hotmail.com

Palavras-chave: *Trichoderma*; Fontes de carbono; Fitopatógenos; Enzimas hidrolíticas

INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma espécie susceptível à patógenos de solo que causam podridão da raiz (*Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*) e o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Ricardo et al., 2009). As perdas por essas infecções fúngicas podem ser identificadas durante o desenvolvimento do vegetal e até mesmo no pós-colheita (Bettiol & Morandi, 2009).

A propagação das doenças nas lavouras é favorecida pela umidade e baixas temperaturas encontradas no solo. Embora o controle desses patógenos possa ocorrer pela utilização de fungicidas químicos, estes são caros e podem causar contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos seres vivos; a intoxicação de agricultores; a resistência de patógenos; o desequilíbrio biológico, alterações na ciclagem dos nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (Bettiol & Morandi, 2009).

Uma alternativa aos fungicidas é o uso de fungos micoparasitas, como as espécies de *Trichoderma*. Os mecanismos de ação utilizados pelo *Trichoderma* contra esses fitopatógenos são a antibiose, competição por espaço ou nutrientes, micoparasitismo, produção de sideróforos e enzimas hidrolíticas, como as xilanases, quitinases, fosfatases (Harman, 2004).

Pesquisas realizadas no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás observaram que o isolado *Trichoderma harzianum* ALL 42 foi caracterizado como um antagonista efetivo de *Rhizoctonia solani*, bem como um bom produtor de

enzimas hidrolíticas, dentre elas a fosfatase ácida (Lima, 2006; Leitão 2007). O objetivo geral desse trabalho é realizar a identificação do comportamento do fungo *Trichoderma harzianum* ALL 42 em contato direto “in vitro” com diferentes fontes de carbono (glicose, quitina, Parede celular de *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *F. oxysporum*) e a análise da expressão de genes de parede celular fúngica nessas diferentes condições.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esporos do isolado *T. harzianum* ALL42 foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio de TLE composto por: 1g/L de bactopectona, 0,3g/L de uréia, 2,0g/L de KH_2PO_4 , 1,4g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e solução de elementos traços; suplementado com 1,5% de glicose e crescido por 24 horas. O micélio foi filtrado em papel filtro, lavado com 250 mL de solução salina 0,9% e transferido para frascos contendo meio mínimo [2,0g/L de KH_2PO_4 , 1,4g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e solução de elementos traços] suplementado com 1,5% de glicose, quitina 0,5%, 0,5% de parede celular de *F. solani*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28°C e velocidade de 180 rpm. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas de incubação o sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte de enzimas hidrolíticas. Em todas as induções descritas acima foram coletados os micélios para posterior extração de RNA e análise da expressão de *qid74*, *qid3*, *ooc1* e *hfb1*.

As atividades de NAGase e fosfatase ácida foram determinadas usando os substratos pnp-derivados: *p*-nitrofenil- β -N-acetilglicosamina (*p*-NPNAG) (5 mM) e *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) (5 mM). As misturas de ensaio continham 10 μL da amostra, 40 μL de solução de pnp-derivado e 100 μL de tampão. A molaridade e os pHs dos tampões foram: tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0 e 4,8, para NAGase e fosfatase ácida, respectivamente. Após incubação da mistura a 37 °C por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 μL de NaOH 0,1 M. A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*-NP) foi determinado espectrofotometricamente a 405nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μmol de *p*-NP por minuto.

A atividade de lipase foi determinada usando *p*-nitrofenil-palmitato (*p*-NPPa) (Sigma Chemical Company) como substrato na concentração de 5 mM em acetonitrila (JAIN *et. al.*, 2005). A mistura de ensaio continha 100 µL da amostra, 20 µL de solução de *p*-NPPa e 100 µL de tampão fosfato/citrato 0,1 mM, pH 7,0 com 0,27 M de NaCl e 0,9% v/v Triton X-100. Após incubação da mistura a 37 °C por 30 minutos, a reação foi levada ao microondas e irradiada por 30 segundos. As unidades enzimáticas foram calculadas como anteriormente.

A atividade de proteases foi determinada usando azocaseína (Sigma Chemical Company) como substrato a 0,25% preparada em tampão Fosfato/Citrato 50mM, pH 5,0, e Tris-HCl 50mM, pH 8,5 para proteases ácida e básica, respectivamente, como proposto por CABRAL *et. al.* (2004). A mistura de ensaio continha 20 µL da amostra, 40 µL de solução de azocaseína e 40 µL de tampão. Após incubação da mistura a 37 °C por 30 minutos, adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e incubada a 4°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 30 minutos, 100 µL do sobrenadante foi misturado com 100 µL de NaOH 1M. A leitura foi determinada espectrofotometricamente a 450 nm. Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para aumentar 1 abs por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior atividade enzimática de NAGase foi observada no inóculo que continha parede celular de *F. oxysporum* em 24h (0,158 U.ml⁻¹) e 48h (0,143 U.ml⁻¹) e *F. solani* em 24h (0,006 U. ml⁻¹). Na fonte contendo quitina, observou-se uma atividade enzimática intermediária em 24h (0,028 U.ml⁻¹) e 48h (0,055 U.ml⁻¹), em relação aos inóculos citados anteriormente. Em relação às outras fontes de carbono (glicose, parede celular de *R. solani* e *S. sclerotiorum*), a atividade enzimática dessa respectiva enzima não foi observada ou expressiva.

Em fosfatase ácida, a maior atividade enzimática foi observada em *F. solani* e *F. oxysporum*, sendo que em presença de *F. solani* a atividade enzimática se destacou em 8h, 12h, 24h e 48h (0,146 U.ml⁻¹, 0,126 U.ml⁻¹, 0,067 U.ml⁻¹, 0,109 U.ml⁻¹, respectivamente). Na indução em presença de parede de *F. oxysporum*, as

maiores atividades enzimáticas foram obtidas em 12h, 24h e 48h (0,131 U.ml⁻¹, 0,126 U.ml⁻¹, 0,155 U.ml⁻¹, respectivamente). Entre as induções que praticamente não apresentaram atividade enzimática, é válido ressaltar a indução de quitina 12h e parede celular de *S. sclerotiorum* 24h, onde apresentaram atividade de fosfatase ácida de 0,023 U.ml⁻¹ e 0,023 U.ml⁻¹, respectivamente. Nas induções contendo glicose e parede celular de *R. solani*, a atividade enzimática observada foi desprezível.

Nas proteases (ácidas e básicas), as induções contendo glicose apresentaram baixa atividade enzimática em relação às outras induções. As induções contendo quitina apresentaram atividade nos tempos de 12h (4,650 U.ml⁻¹), 24h (5,525 U.ml⁻¹) e, com um pico de atividade enzimática, 48h (9,400 U.ml⁻¹). Em relação às quatro paredes utilizadas, as maiores atividades enzimáticas foram observadas em *F. oxysporum* e *F. solani*, sendo que em *R. solani* e *S. sclerotiorum* as atividades foram inexpressivas em relação às anteriores.

Na maioria das induções a atividade de lipase não foi expressiva, sendo que apenas em *F. oxysporum* e *F. solani*, em um tempo de 48h, apresentaram atividade enzimática (0,003 U.ml⁻¹, 0,003 U.ml⁻¹, respectivamente).

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos por meio das atividades enzimáticas realizadas, espera-se correlacionar com a expressão dos genes de *qid74*, *qid3*, *ooc1* e *hfb1* e identificar uma possível interação entre as enzimas analisadas e a expressão dos genes citados no intuito de obter conhecimento sobre a interação entre parede de *Trichoderma* e os fitopatógenos pesquisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CÓDON, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona-Spain, v. 7, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.7-14.

CABRAL, C. M.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMÕES, N. Purification and Characterization of Two Distinct Metalloproteases Secreted by the Entomopathogenic Bacterium *Photobacterium* sp. Strain Az29. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70 (7). p. 3831-3838. 2004.

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., Chet, I., LORITA, M. *Trichoderma* species opportunistic, virulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology** n.2, p. 43-56, 2004.

JAIN, P.; JAIN, S.; GUPTA, M. N. A microwave-assisted microassay for lipases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 381. p. 1480-1482. 2005.

Leitão, V.O., Lima, R. C. M., Vainstein, M. H., Ulhoa, C. J., **Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum***, *Biotechnology Letters*, 2010; DOI 10.1007/s10529-010-0264-2.

Lima, R.C.M., **Caracterização de uma fosfatase ácida produzida por *Trichoderma harzianum***, 2006. 54 fl. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2006.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, Barcelona-Spain, v. 4, p. 1-4, 2001.

RICARDO, T. R.; WANDER, A. E.; LOBO JUNIOR, M.; PICANÇO FILHO, A. F. Custos associados ao mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro comum de 3a. safra em Goiás. In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Desenvolvimento rural e sistemas agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações: anais**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009. 1 CD-ROM.