

## Métodos para Indução e Análise de Enzimas Micolíticas Secretadas por *Dicyma pulvinata*

O mal-das-folhas é uma das mais destrutivas doenças da seringueira (*Hevea* sp.) gerando perdas de até 100 % na produção (Gasparotto et al., 1990). O patógeno, *Microcyclus ulei*, se dissemina principalmente sob a forma de conídios, que em condições favoráveis de temperatura e umidade, germinam, penetram no limbo foliar e, ao colonizarem os tecidos, provocam lesões necróticas, redução do processo fotossintético e até mesmo a morte das plantas. Os ataques sucessivos da doença debilitam as plantas, tornando-as altamente vulneráveis ao ataque de fitopatógenos secundários (Gasparotto et al., 1984).

O controle biológico é altamente desejável, mesmo quando associado a outros métodos, por promover menor impacto ambiental e desequilíbrio ecológico (Bettiol, 1991). Os mecanismos básicos pelos quais os microrganismos agentes de biocontrole podem atuar são por meio de interações antagonísticas, tais como, antibiose, competição e micoparasitismo (Melo & Azevedo, 1998).

Dentre as medidas de controle mais promissoras para o mal-das-folhas destaca-se o biocontrole, usando o fungo *Dicyma pulvinata* (Berck & Curtis) Arx (syn. *Hansfordia pulvinata*). Vários estudos têm demonstrado o elevado potencial de controle deste micoparasita sob condições de campo. Colonizando as lesões, *D. pulvinata* impede a esporulação do patógeno, por mecanismos ainda desconhecidos, reduzindo o desfolhamento das plantas e a taxa de inóculo para evitar novas infecções. Entretanto, o potencial de uso deste agente de biocontrole esbarra em sua baixa taxa de crescimento em substratos artificiais e no desconhecimento da natureza de suas enzimas micolíticas, compondo fatores a serem superados para o uso de *D. pulvinata* em escala comercial.

Existe na literatura (Chet, 1987, 1992; Chet, & Inbar, 1994; De La Cruz et al., 1992, 1995; Lima et al., 1997, 1999, 2000; De Marco et al., 2000), informações sobre o desempenho fundamental das enzimas micolíticas na hidrólise da parede de fungos fitopatogênicos. Sendo assim, pode existir uma correlação entre o potencial antagonístico e a secreção enzimática pelo parasita, refletindo na eficiência de biocontrole. A avaliação da produção de enzimas micolíticas produzidas por linhagens de *D. pulvinata* é de caráter importante no entendimento do mecanismo molecular, responsável pela ação antagonística deste micoparasita sobre o fitopatógeno *M. ulei*. A proposta para estudos bioquímicos mais detalhados foi o principal objetivo deste trabalho, fornecendo dados para a seleção de linhagens com potencial para o biocontrole de *Microcyclus* e estabelecendo uma metodologia para indução e identificação de enzimas hidrolíticas, relacionadas ao parasitismo de *D. pulvinata*.

Sendo assim, conídios da linhagem CG 772 de *D. pulvinata* foram semeados em 25 mL de meio YG (glicose 25 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup> e ágar 20 g L<sup>-1</sup> pH 5,5), MYG (extrato de malte 5 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 2,5 g L<sup>-1</sup>; glicose 25 g L<sup>-1</sup> e ágar 20 g L<sup>-1</sup> pH 5,5) e MYPG (maltose 3 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 3 g L<sup>-1</sup>; peptona 5 g L<sup>-1</sup>; glicose 20 g L<sup>-1</sup> e ágar 20 g L<sup>-1</sup> pH 5,5) e mantidos a 28° C por 15 dias. Após a esporulação, as placas foram lavadas com 5 mL de 0,01% de tween 80 e os conídios, diluídos e contados em hemocitômetro.

Para o crescimento em meio líquido, 2x10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup> foram inoculados em 50 mL dos meios YG, MYG e MYPG e mantidos a 28 °C e 150 rpm. Após quatro dias de crescimento, o micélio foi filtrado em papel Whatman n° 2, lavado com dois volumes de água destilada e mantido por 24 horas a 80 °C, para determinação do peso seco.

Brasília, DF  
Novembro, 2002

### Autores

**Paulo Roberto Queiroz**

Biólogo, M.Sc., bolsista,  
Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia.

**Wendel Neiva Martins Lago**

Estagiário graduando, Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia.

**Raquel Adjafre da Costa  
Matos**

Estagiária graduanda, Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia.

**Luzia Helena Corrêa Lima**

Bióloga, PhD, Bioquímica,  
Pesquisador Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia.

**Sueli Corrêa Marques de  
Mello**

Eng. Agr<sup>o</sup>., PhD, Fitopatologia,  
Pesquisador Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia.

Para a obtenção de micélio,  $2 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  foram inoculados em 50 mL de meio YG e mantidos a 28 °C e 150 rpm. Em intervalos de 24 h, o micélio foi filtrado, lavado com dois volumes de água destilada e submetido a secagem, em estufa, para determinação do peso seco. Os consumos de glicose e proteína foram determinados pelos kits Glucox e Proteínas totais, seguindo-se as instruções do fabricante (Dolles).

Após o crescimento em meio YG por 72 horas em incubadora a 28 °C e 150 rpm, o micélio foi filtrado, lavado com 100 mL de água destilada estéril. A partir dessa etapa foram testados dois meios de cultura com o objetivo de induzir a produção enzimática; meio sintético e meio mínimo. Dessa forma, a transferência de micélio já filtrado e lavado foi feita tanto para 50 mL de meio sintético ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,6 g  $\text{L}^{-1}$ ; KCl 0,15 g  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,0 g  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  6,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  4,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CoCl}_2$  2,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ; pH 5,5) como para 50 mL de meio mínimo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0 g  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,3 g  $\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,3 g  $\text{L}^{-1}$ ; Elementos Traços 1,0 mL  $\text{L}^{-1}$ , pH 5,5), respectivamente, suplementados com 0,5 % de quitina como fonte de carbono.

Em intervalos de 24 horas, os meios de crescimento em estudo foram filtrados e analisados quanto a presença de quitinase, protease, glucanase e N-acetilglicosaminidase. O conteúdo protéico foi determinado segundo a metodologia descrita por Bradford (1976). A atividade de quitinase foi baseada no método de Molano et al. (1977). Para a atividade de N-acetilglicosaminidase utilizou-se a metodologia descrita por Yabuki et al. (1986). A determinação da atividade proteolítica foi efetuada segundo Kunitz (1946). A atividade glucanólítica foi feita segundo Elad et al. (1982) Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de alterar a absorbância em 0,1nm em 1 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A Fig. 1 mostra que a linhagem CG 772 de *D. pulvinata* quando crescida em meio MYPG apresentou maior esporulação ( $2,853 \times 10^9$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ) do que no meio MYG ( $1,533 \times 10^9$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ) e no meio YG ( $1,153 \times 10^9$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ), apesar de todos os valores serem satisfatórios quanto a produção de esporos.

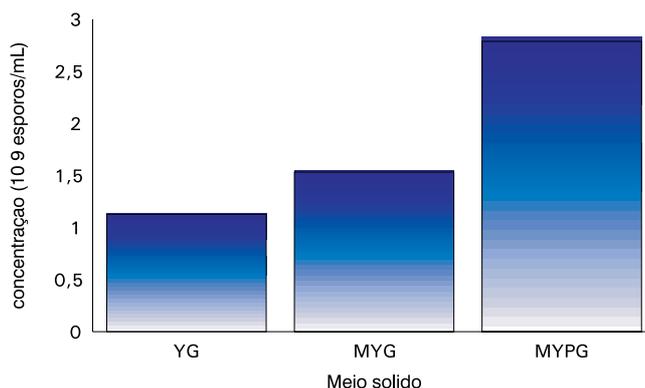


Fig. 1. Produção de esporos do isolado de *D. pulvinata* CG 772 em diferentes meios sólidos.

Entretanto, quando do inóculo até ao final de sete dias de crescimento do fungo, os meios líquidos MYG (612 mg de micélio seco) e YG (556 mg de micélio seco) apresentaram uma produção maior de massa micelial do que o meio MYPG (500 mg de micélio seco). No entanto, se comparada a produção de biomassa dos meios MYPG, MYG e YG, os valores obtidos foram bem próximos (Fig. 2). Um outro aspecto observado foi a composição dos meios MYG e YG serem bem mais simples do que a do meio MYPG.

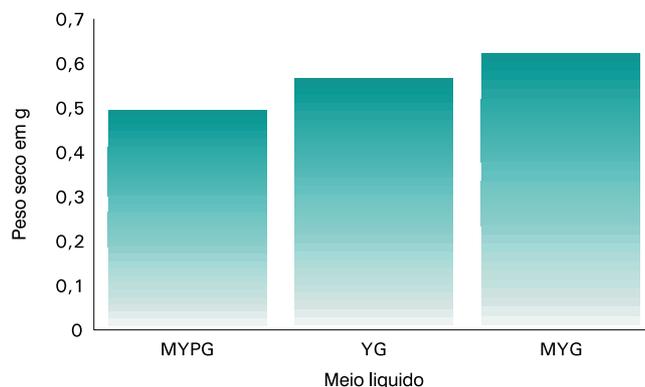
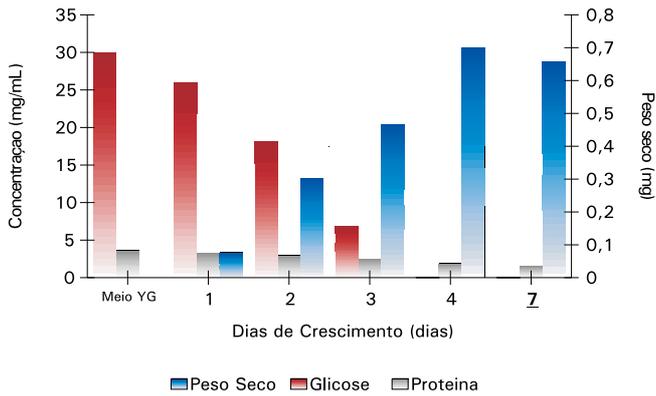


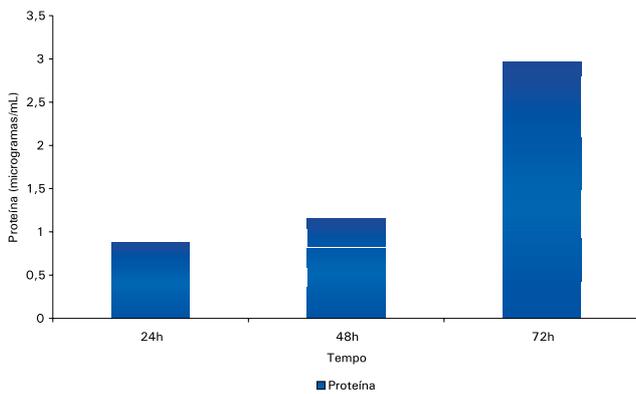
Fig. 2. Crescimento do isolado de *D. pulvinata* CG 772 em diferentes meios de cultura líquidos.

Dessa forma, o meio YG foi então selecionado por apresentar simplicidade na sua composição e dados satisfatórios quanto à produção de esporos e massa micelial. O período de 72 h de incubação foi estabelecido como ideal para crescimento do fungo, após a determinação do peso seco e do consumo de carbono e nitrogênio da composição do meio. Observou-se também, que essa fase de atividade metabólica é a mais adequada à realização das etapas posteriores de indução enzimática (Fig. 3).



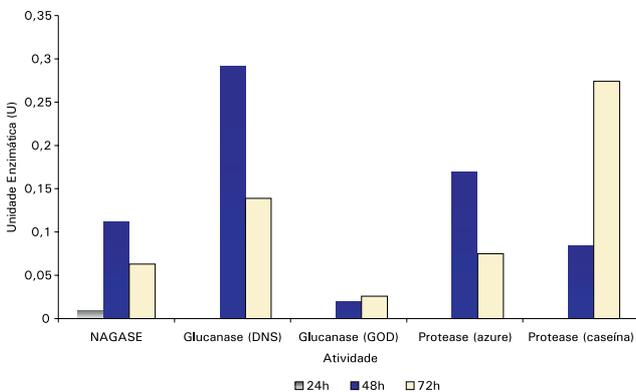
**Fig. 3.** Crescimento do isolado de *D. pulvinata* CG 772, em meio líquido YG (peso seco) e determinação do consumo de glicose e proteína.

A Fig. 4 mostra um período crescente na produção de proteínas totais, secretadas em meio sintético contendo quitina como indutor. Pode-se observar que o maior tempo de indução protéica ocorreu ao final de 72h (2,95 µg/mL).



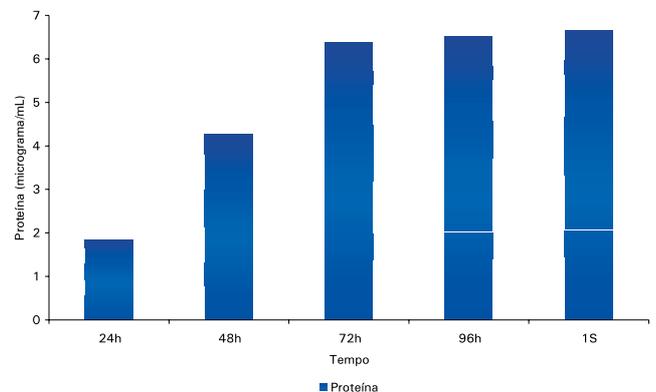
**Fig. 4.** Secreção de proteínas do isolado de *D. pulvinata* CG 772 ao longo de 72 h de crescimento em meio sintético contendo quitina como indutor.

A análise dos filtrados revelou a presença de atividade enzimática relacionada ao micoparasitismo (Fig. 5).



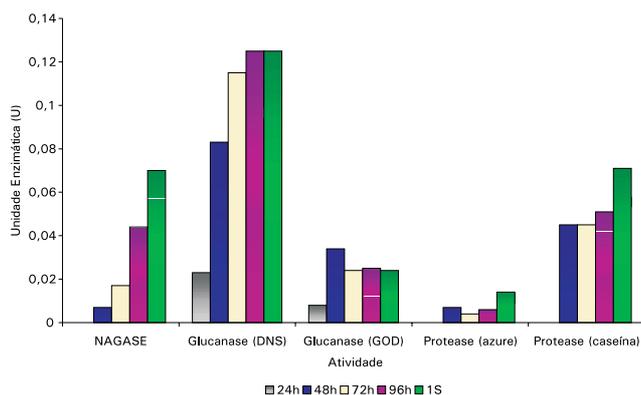
**Fig. 5.** Análise da atividade enzimática do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio sintético contendo quitina como indutor.

A atividade para a enzima N-acetilglicosaminidase (NAGase) revelou pico máximo em 48 h de incubação (0,11 U) na presença de quitina, decrescendo após o período. Provavelmente, esse resultado pode estar relacionado ao processo de repressão catabólica. A detecção de glucanases também foi confirmada, sendo que, para endoglucanases (sistema DNS), a maior atividade foi em 48 h de indução (0,295 U), enquanto para exoglucanases (0,023 U) em 72 h (sistema GOD). A variação nas atividades das respectivas enzimas poderia ser explicada pelo sinergismo enzimático controlado por uma possível regulação metabólica. Entretanto, não se detectou pelos métodos disponíveis, atividade enzimática para quitinase, requerendo assim, mais estudos na determinação do tempo de indução. Atividade proteolítica foi analisada por dois métodos distintos, onde se observou variação nos picos de atividade. Para o sistema onde foi utilizada proteína marcada (azure), o ápice enzimático foi em torno de 48 h de indução. Quando se usou caseína como substrato, o pico máximo atingido foi de 72 h de incubação, na presença de quitina. A determinação das proteínas totais secretadas no meio mínimo, contendo quitina, demonstrou liberação crescente durante o período de indução, sendo que, a concentração maior de proteína secretada foi obtida a partir de 72 horas (Fig. 6).



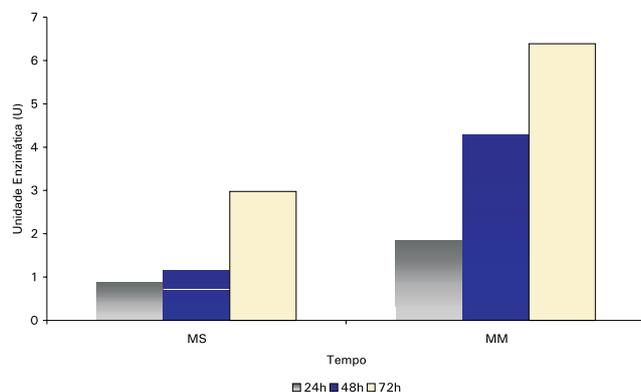
**Fig. 6.** Secreção de proteínas do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio mínimo contendo quitina.

A análise dos filtrados provenientes do meio mínimo revelou a presença de atividade para enzimas hidrolíticas (Fig. 7).



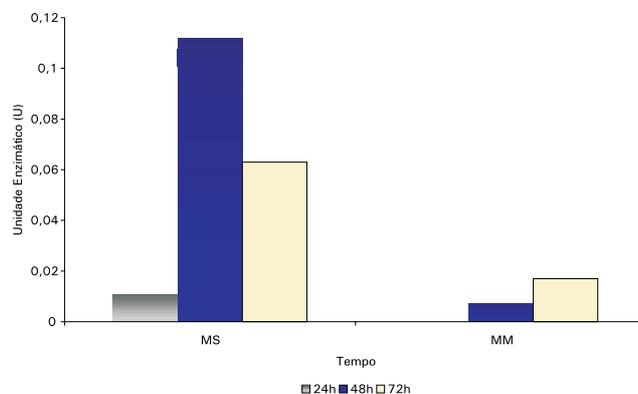
**Fig. 7.** Determinação de atividade enzimática do isolado de *D. pulvinata* CG 772 durante o crescimento em meio mínimo contendo quitina como indutor.

A análise enzimática para NAGase revelou atividade crescente durante o período de uma semana, atingindo nesse tempo o seu pico máximo (0,073 U), após uma semana de incubação na presença de quitina. Os ensaios para a análise de glucanases indicaram que as endoglucanases (sistema DNS) apresentaram a maior atividade (0,129 U) em 96 h, mantendo-se inalterada até uma semana de indução, por outro lado, as exoglucanases (sistema GOD) apresentaram o pico máximo de atividade (0,037 U), em 48 h de indução, após este período houve queda na atividade. A variação nas atividades das respectivas enzimas, se comparada aos dados obtidos com o crescimento em meio sintético, pode-se afirmar que ocorreu também um sinergismo enzimático, controlado por uma possível regulação metabólica. A atividade enzimática para quitinase não foi detectada, havendo necessidade de novas avaliações futuras, com mudanças específicas nas condições de indução. Utilizou-se dois métodos distintos para análise da atividade proteolítica, observando-se em ambos, pico máximo de atividade após uma semana de indução. A análise da quantidade de proteínas totais secretadas nos meios utilizados revelou liberação progressiva com ápice após 72 h de indução sendo que o meio sintético apresentou maior conteúdo proteico secretado (Fig. 8).



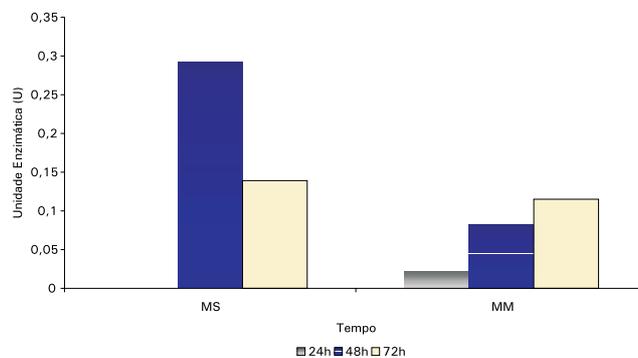
**Fig. 8.** Secreção de proteínas totais do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio sintético (MS) e meio mínimo (MM) contendo quitina.

A Fig. 9 mostra a produção da enzima NAGase pela linhagem CG 772 de *D. pulvinata* crescida tanto em meio sintético quanto em meio mínimo. O pico máximo de atividade (0,117 U) foi obtido em 48 h, em meio sintético.



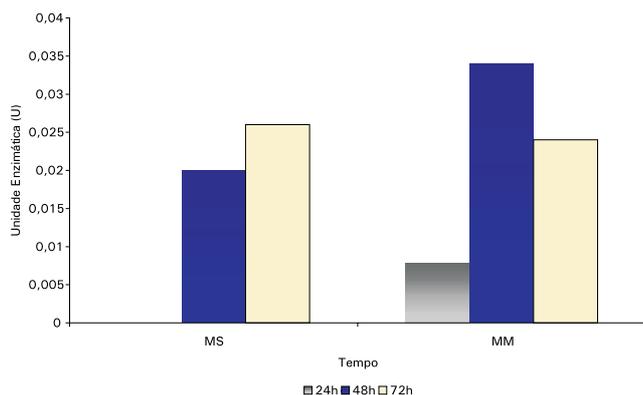
**Fig. 9.** Atividade de NAGase (U) do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio sintético (MS) e meio mínimo (MM) contendo quitina.

Utilizou-se duas metodologias para analisar a atividade de  $\beta$ -glucanase (reagente dinitrossalicilato-DNS e glicose oxidase-GOD), tanto no filtrado do meio mínimo quanto do meio sintético. Observando-se os resultados pelo método DNS, o pico máximo de atividade enzimática foi de 0,293 U após 48 h de indução em meio sintético (Fig. 10). Em meio mínimo, houve apenas um aumento progressivo na atividade glucanolítica no período de 72 h de indução.



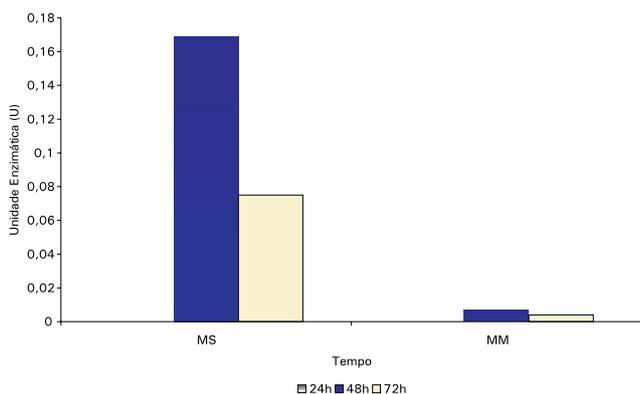
**Fig. 10.** Atividade de  $\beta$ -glucanase (U) (método DNS) do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio sintético (MS) e meio mínimo (MM) contendo quitina.

A análise de  $\beta$ -glucanase, pelo método Glicose Oxidase - GOD, indicou maior atividade (0,005 U) em meio mínimo, após 48 h de indução, enquanto que em meio sintético (0,002 U) o aumento da atividade específica esteve na faixa de 72 h de indução (Fig. 11).



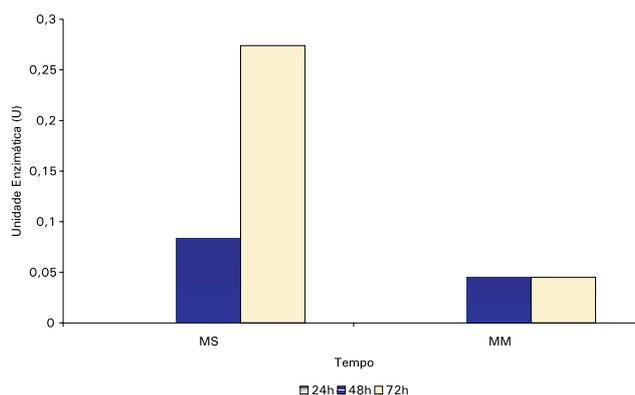
**Fig. 11.** Atividade de  $\beta$ -glucanase (U) (método GOD) do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio sintético (MS) e meio mínimo (MM) contendo quitina.

A análise da atividade proteolítica, utilizando-se substrato marcado (azure), indicou atividade específica (0,170 U) após 48 h de indução em meio sintético. Contudo, a atividade de protease (0,007 U), após 48 h de indução em meio mínimo, foi reduzida significativamente, quando comparada a anterior (Fig. 12).



**Fig. 12.** Atividade de protease (U) do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio sintético (MS) e meio mínimo (MM) contendo quitina, usando-se substrato marcado (Azure).

A detecção da atividade proteolítica, usando-se caseína como substrato, indicou também uma atividade específica superior (0,27 U) quando da utilização de meio sintético. No entanto, o pico máximo atingido foi revelado após 72 h de indução e não 48 h, como ocorrido no caso anterior. Para a atividade em meio mínimo, observou-se valor constante a partir de 48 h (Fig. 13).



**Fig. 13.** Atividade de protease (U) do isolado de *D. pulvinata* CG 772 incubado em meio sintético (MS) e meio mínimo (MM), utilizando-se caseína como substrato, na presença de quitina.

As ferramentas básicas que contribuem para o controle do mal-das-folhas da seringueira são constituídas, em grande parte, pela elaboração de estudos preliminares no que diz respeito à bioquímica e a fisiologia de fungos, como agentes de biocontrole. Dessa forma, o estabelecimento de protocolos para o estudo das bases do micoparasitismo por *D. pulvinata* são importantes para o uso do mesmo em escala de biocontrole. Além disso, mais experimentos poderão ser realizados, no sentido de se obter as condições ideais para otimizar a produção da enzima que se deseja estudar, assim como, obter esclarecimento sobre o processo envolvido na regulação gênica das enzimas envolvidas no micoparasitismo desse potencial agente de biocontrole.

## Referências Bibliográficas

- BETTIOL, W. Seleção de Microrganismos Antagônicos a Fitopatógenos. In: Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1991. p.225-236.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CHET, I. *Trichoderma* - Application, mode of action and potential as a biocontrol agents of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I., ed. Innovative approaches to plant disease control. New York: J. Wiley, 1987. p.137-160.
- CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: Environmental microbiology. New York: Wiley-Liss, 1992. p.335-354.
- CHET, I. & INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.48, p.37-43, 1994.

DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, v.206, p.859-867, 1992.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.6937-6945, 1995.

DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa* the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.383-386, 2000.

ELAD, Y., CHET, I. & HENIS, Y., Degradation of Plant Pathogenic Fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology** v.28, p.719-725, 1982.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **Journal of General Physiology**, v.29, p.149-154, 1946.

LIMA, L. H. C.; ULHOA, C.J.; FERNANDES, A. P.; FELIX, C. R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.43, p.31-37, 1997.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; ULHOA, C. J.; FELIX, C. R. Synthesis of a *Trichoderma* chitinase which affects

the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Folia Microbiologica**, v.44, p.45-49, 1999.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas Hidrolíticas Envolvidas no Controle Biológico por Micoparasitismo. In: Controle Biológico, 2000. p. 263-304, v. 2. ED. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP..

MOLANO, J.; DURAM, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v.83, p.648-656, 1977.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; LIMA, M.I.P.M., PEREIRA, J.C.R.; SANTOS, A.F. *Enfermidades da Seringueira no Brasil*. Manaus; Embrapa-CPAA.. 1990. p.169. Série Embrapa Circular Técnica, IV.

GASPAROTO, L.; LIEBEREI, R.; TRINDADE, D.R. Germinação de Conídios de *Microcyclus ulei* e sua Sensibilidade a Fungicidas "In Vitro". **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.505-511, 1984.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico, v. 1. ED. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 1998. p.69-96.

YABUKI, M.; MIZUSHIMA, K.; AMATATOU, T.; ANDO, A.; FUJI, I.; SHIMADA, M.; YAMASHIDA, M. Purification and characterization of chitinase and a chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp *anaerogenes* A52. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.32, p.25-32, 1986.

## Circular Técnica, 17

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -  
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 150 unidades

## Comitê de publicações

**Presidente:** José Manuel Cabral de Sousa Dias  
**Secretário-Executivo:** Miraci de Arruda Camâra Pontual  
**Membros:** Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

## Expediente

**Supervisor editorial:** Miraci de Arruda Camâra Pontual

**Normalização Bibliográfica:** Maria Alice Bianchi

**Editoração eletrônica:** Alysson Messias da Silva