

Regulação da expressão de N-acetil- β -D-glicosaminidase, quitinases e β -1,3-glucanases produzidas por *Trichoderma harzianum*

ALMEIDA, Fausto Bruno Dos Reis¹; ULHOA, Cirano José².

Palavras-chave: N-acetil- β -D-glicosaminidase; β -1,3-glucanases, *Trichoderma*.

1.INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* é descrito como um agente de controle biológico utilizado contra alguns fitopatógenos, tais como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium sp* (Herrera-Estrella & Chet, 1998). Um dos mecanismos de antagonismo deste fungo é denominado de micoparasitismo e se caracteriza pela produção de enzimas hidrolíticas, como quitinases (EC. 3.2.1.14) e N-acetilglicosaminidase (EC. 3.2.1.30), responsáveis pela quebra da parede celular do fungo hospedeiro. Existem evidências de que o micoparasitismo ocorre através de eventos seqüenciais, que vão desde o reconhecimento até o contato direto com o hospedeiro com a expressão de genes específicos (Herrera-Estrella & Chet, 1998). As enzimas do sistema quitinolítico e as β -1,3-glucanases produzidas por isolados de *Trichoderma sp.*, tem sido comparadas como as principais hidrolases envolvidas no processo de micoparasitismo. A Quitina, é um polímero linear insolúvel formado por unidades de β -1,4-N-acetilglicosamina, é encontrada em diferentes organismos. Na grande maioria dos fungos, este polissacarídeo está presente como um importante componente da parede celular, conferindo proteção à célula (Sahai & Manocha, 1993). Este trabalho teve como objetivo a avaliação das enzimas N-acetil- β -D-glicosaminidase e β -1,3-glucanases produzidas por *T. harzianum* (T-37) e *T. asperellum* (T-00) em meio contendo parede celular de *Rhizoctonia solani* na presença de moduladores que aumentam os níveis intracelulares de AMPc.

2.METODOLOGIA

2.1 - Manutenção do fungo: O fungo *Trichoderma harzianum* (T-00) e *Trichoderma asperellum* (T-37), da Coleção do Laboratório de Enzimologia / UFG, são mantidos com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocado a 4°C.

2.2 - Produção de Enzimas: Esporos dos isolados T-37 e T-00, foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio de TLE composto por: 1g/L de bactotripton, 0,3g/L de uréia, 2,0g/L de KH₂ PO₄, 1,4g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,3g/L de MgSO₄.7H₂O, 0,3g/L de CaCl₂.6H₂O e solução de elementos traços; suplementado com 0,5% de parede celular de *R. solani*, mais o modulador a ser testado. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28°C e velocidade de 150 rpm. Após 48 horas de incubação o sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte de enzimas.

2.3 - Atividade Enzimática: A atividade de N-acetilglucosaminidase foi determinada segundo metodologia descrita por Ulhoa e Peberdy (1992a), utilizando p-nitrofenol-N-acetilglicosamina como substrato. A atividade de β -1,3-glucanase foi determinada utilizando laminarina (Sigma.Co) na concentração de 0,25%, em tampão acetato de sódio 50mM.L⁻¹ pH 5,0. A mistura da reação é composta por 100 μ L de substrato e 50 μ L de enzima e incubada a 40°C por 30 minutos. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de açúcar redutor em um minuto.

2.4 - Determinação de Proteína: A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina (Sigma-Co) como padrão.

2.5 - Caracterização eletroforética: Para análise do perfil de proteínas secretadas no meio de cultura foi utilizado um sistema de eletroforese (MiniGel-Sigma) em gel de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Ao final da corrida o gel foi corado pelo método de coloração com coomassie brilhante blue.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade enzimática de N-acetil- β -D-glicosaminidase e de β -1,3-glucanase foi avaliada em meio líquido após crescimento dos isolados T-37 e T-00 por 48 horas a 28°C e 150 rpm, contendo parede celular de *R. solani* 0,5% como fonte de carbono, na presença de diferentes moduladores. Quando testamos com cafeína, a enzima β -1,3-glucanase não apresentou variação na atividade, mas a enzima NAGase teve queda de atividade de acordo com a concentração de cafeína utilizada. O dibutiril não apresentou efeito modulador significativo na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e NAGase. Quando utilizamos EDTA, a atividade das enzimas foi inibida, mas o EDTA não é um quelante específico de cálcio, onde fez necessária a utilização de um quelante específico de cálcio, portanto, utilizamos o EGTA, onde novamente a atividade das enzimas foi inibida.

4. CONCLUSÃO

Nossos dados mostraram que o perfil das proteínas secretadas por *T. harzianum* (isolados T-37 e T-00), no meio contendo parede celular de *R. solani*, foi alterado de acordo com o modulador utilizado. A cafeína não possui um efeito modulador na enzima β -1,3-glucanase; já na enzima NAGase, quanto maior a concentração de cafeína, menor a atividade de NAGase, devido a cafeína atuar na atividade de fosfodiesterase, inibindo sua atividade, e impedindo portanto que o AMPc seja degradado. O dibutiril não apresentou efeito modulador significativo na atividade de β -1,3-glucanase e de NAGase. Quando utilizamos EDTA e EGTA, a atividade das enzimas foram inibidas, sugerindo assim que a via da NAGase seja dependente de cálcio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis** 8: 93 – 93.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 680 – 685.
- HERRERA-ESTRELLA, A. & CHET, I (1998). Biocontrol of bacteria and phitopathogenic fungi. In **Agriculture Biotechnology**. Ed. Arien. Dekker, Inc. New York. Pp. 263-282.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature** (London) 227: 680-685.
- SAHAI, A.S. & MANOCHA, M.S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Review** 11: 317-388.
- ULHOA, C.J. & PEBERDY, J.F. (1992a). Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microbial and Technology** 14: 236-240.

Fonte de Financiamento: CNPq/PIBIC, FUNAPE.

¹. Bolsista de Iniciação Científica. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Enzimologia. faustobio@yahoo.com.br

². Orientador/ Instituto de Ciências Biologias/ UFG. ulhoa@icb.ufg.br