

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DAS β -1,3-GLUCANASES PRODUZIDAS POR *Trichoderma asperellum*

STEINDORFF, Andrei S.¹; MARCELLO, Cesar M.²; ULHOA, Cirano J.³

Palavras-chave: *Trichoderma asperellum*, cerrado brasileiro, β -1,3-glucanases

1- INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos filamentosos saprófitas de solo, encontrados sobre matéria orgânica em decomposição e na rizosfera de algumas plantas. Desde 1991 que nosso grupo (Laboratório de Enzimologia / ICB - UFG) tem concentrado esforços no sentido de contribuir para o entendimento do papel de enzimas hidrolíticas no mecanismo de micoparasitismo e controle biológico. A colonização demonstrada por *T. asperellum* é um indicativo de atuação por micoparasitismos, onde podemos observar um crescimento rápido em direção ao hospedeiro e enrolamento em torno da sua hifa. O entendimento do modo de ação das hidrolases, principalmente quitinases, N-acetilglucosaminidases e β -1,3-glucanases, na degradação da parede celular do fitopatógeno sua regulação, e a ação das lecitinas, são mecanismos que se elucidados permitirão o melhoramento genético gerando espécies de alto potencial em biocontrole. Temos como objetivo nesse trabalho a avaliação da produção e expressão de β -1,3-glucanases por *T. asperellum* utilizando diferentes concentrações de parede celular de *R. solani*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Manutenção dos isolados de *T. asperellum*

Os isolados de *Trichoderma asperellum*, 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 estocados a 4°C. A purificação de parede celular de *R. solani* foi realizada segundo MITCHEL e TAYLOR, 1969.

2.2- Produção de enzimas e determinação das atividades enzimáticas

Esporos dos isolados de *Trichoderma asperellum*., 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 0,5% de glicose e crescido por 24 horas. O micélio foi transferido para outros frascos iguais, com o mesmo meio TLE, mas utilizando como fonte de carbono 0,1, 0,2, 0,3 e 0,5% de parede celular isolada e purificada de *Rhizoctonia solani*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28°C e velocidade de 180 rpm. Após 12 e 24 horas de incubação o sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte de β -1,3-glucanases (Bara 2002). 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, de acordo com a metodologia descrita por Noronha & Ulhoa (1996). 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.

2.3- Caracterização eletroforética e zimograma

Para análise do perfil de proteínas secretadas no meio de cultura foi utilizado um sistema de eletroforese (MiniGel-Sigma) em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Ao final da corrida o gel será corado pelo método coloração com nitrato de prata segundo metodologia descrita por Blum *et al.*, 1987. Para a determinação da atividade em gel de poliacrilamida (12%) as condições de corrida foram as mesmas descritas no item 6, exceto que o tampão de amostra não continha β -mercaptoetanol e as amostras não foram fervidas.

2.4- Extração de RNA e Northern blot-gel

A extração de RNA foi feita pelo método descrito por Chirgwin (1987) utilizando sais de guanidina. Para a análise do RNA extraído e seguinte transferência para membrana de nitrocelulose, foi utilizado um sistema de eletroforese em gel de agarose 1,2% como descrito por Chirgwin (1987).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Micélio crescido por 24 horas em glicose de *T. asperellum* foram transferidos para meio de cultura contendo concentrações crescentes de parede celular de *R. solani* (PCRS) como fonte de carbono. O sobrenadante de cultura foi coletado após 12 e 24 horas e usado para determinar a atividade de β 1,3-glucanase. Observamos que o fungo apresentou atividade crescente de β -1,3-glucanase no sobrenadante de cultura de acordo com a quantidade de PCRS (Figura 1). A atividade específica teve seu pico com 0,2% de PCRS no tempo de 24 horas de indução e ocorre um decaimento com o aumento da quantidade de PCRS mostrando a produção de outras proteínas nessas induções (Figura 2).

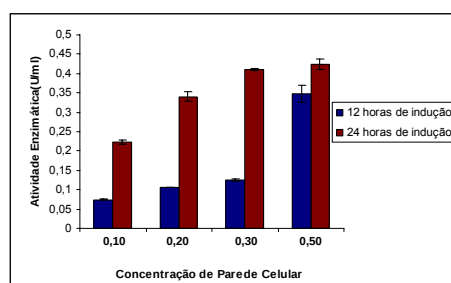


Figura 1- Atividade enzimática em U.mL⁻¹ de β -1,3-glucanase

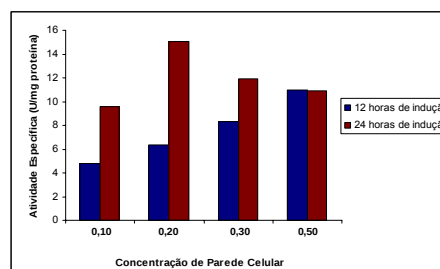


Figura 2- Atividade específica de β -1,3-glucanase em U/mg de proteínas

A figura 3 mostra um perfil protéico similar em todas as amostras, variando a quantidade de proteínas secretadas nas diferentes concentrações de PCRS.

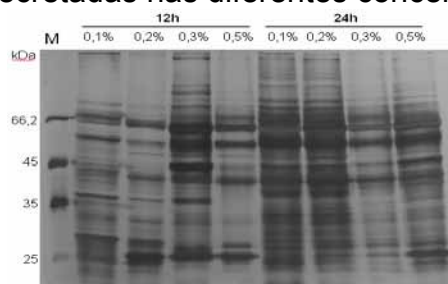


Figura 3- Gel de eletroforese SDS-PAGE mostrando o perfil de proteínas das induções nas diferentes concentrações de PCRS nos tempos de 12 e 24 horas

A figura 4 mostra um zimograma onde aparece em diferentes intensidades a banda de maior peso molecular de β -1,3-glucanase de produzidas pelo *Trichoderma asperellum*. Era esperada a presença de duas isoformas de β -1,3-glucanase (BARA, 2002), o que não aconteceu, talvez devido a sua pequena atividade e quantidade.

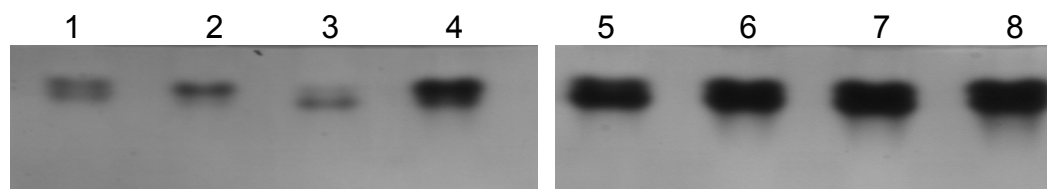


Figura 4- Zimograma mostrando os diferentes padrões de atividade das induções. 1-12 horas 0,1%; 2-12 horas 0,2%; 3-12 horas 0,3%; 4-12 horas 0,5%; 5-24 horas 0,1%; 6-24 horas 0,2%; 7-24 horas 0,3%; 8-24 horas 0,5%

O micélio foi coletado e congelado em nitrogênio líquido para a extração de RNA total. Os RNAs foram extraídos e corrido um gel de agarose. Ainda falta a produção das sondas de β -1,3-glucanase e a hibridização para se saber o nível de expressão dessa enzimas nas diferentes concentrações de substrato. A membrana A será a hibridizada com a sonda de β -1,3-glucanase e o controle 18S será hibridizado com a sonda da subunidade de RNA ribossomal 18S e será utilizado como controle.

4- CONCLUSÃO

Neste primeiro semestre fizemos uma avaliação da produção da enzima β -1,3-glucanase por *Trichoderma asperellum* crescido na presença de diferentes concentrações de parede de *R. solani*. Notamos que a parede celular de *R. solani* é um bom indutor e que a sua concentração influencia na quantidade de enzima secretada pelo *T. Asperellum*. A técnica de Northern blot trará uma melhor capacidade para analisarmos a expressão de β -1,3-glucanase de acordo com a concentração de PCRS. Isso abre novas perspectivas para novos trabalhos sobre regulação e sinalização celular dessa enzima.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARA, M.T., LIMA, A. & ULHOA, C.J. (2003). Purification and characterization of na exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters 219: 81 – 85.

NORONHA, E.F. & ULHOA, C.J. (1996). Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Canadian journal of Microbiology 42: 1039-1044.

CHIRGWIN J.M., MACDONALD, R.J., SWIFT G.H., PRZYBYLA, A.E.(1987). Isolation of RNA using guanidinium salts. Methods in Enzymology, v. 152, p. 219-227

¹Bolsista de iniciação científica. ICB II – Laboratório de enzimologia, andreist@biologia.grad.ufg.br

²Co-Orientador/ IB/UNB, cmmarcello@yahoo.com.br

³Orientador/ ICB II/ UFG, ulhoa@icb.ufg.br

Órgãos financiadores: **Cnpq/Funape/UFG**