

## **DIVERSIDADE DE ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR *Trichoderma harzianum* DURANTE INDUÇÃO COM DIFERENTES PAREDES DE FITOPATÓGENOS COMO FONTE INDUTORA.**

<sup>1</sup>Monteiro, VN; <sup>1</sup>Silva, R. N. & Ulhoa, C. J<sup>1</sup>.

### **1. INTRODUÇÃO**

O processo de parasitismo de *Trichoderma* ocorre principalmente pela participação de enzimas hidrolíticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, celulases e proteases nutrientes (HERRERA-ESTRELLA e CHET, 1998; HARMAN, 2000). Essas enzimas têm atividade antifúngica individualmente e podem atuar em sinergismo quando em mistura ou com os antibióticos. Enzimas extracelulares que hidrolisam os principais componentes químicos da parede celular de fungos, como quitina,  $\beta$ -glucanas e proteínas foram detectadas quando *T. harzianum* cresceu na presença de micélio ou parede celular de *Rizoctonia solani* ou quitina como única fonte de carbono (Kubicek *et al.*, 2001).

O fungo filamentososo *Trichoderma harzianum* é descrito como um potente agente de controle biológico contra uma série de fungos fitopatógenos. Um dos mecanismos de antagonismo deste fungo é denominado de micoparasitismo e se caracteriza pela produção de enzimas hidrolíticas, como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, celulases e proteases nutrientes, responsáveis pela quebra da parede celular do fungo hospedeiro. Este trabalho tem como objetivo avaliar diversidade de enzimas extracelulares produzidas durante indução com diferentes paredes de fitopatógenos como fonte indutora.  $10^7$  Esporos de *Trichoderma harzianum* foram inoculados em 250 ml de meio TLE suplementado com 0,5% de parede celular isolada e purificada de *Fusarium* sp; *Macrophomina phaseolina* e *Rizoctonia solani*. Um controle contendo apenas esporos de *T. harzianum* foi feito para comparação com as induções realizadas. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28°C a 150 rpm. Após 72 horas de incubação o sobrenadante foi coletado e utilizado com fonte de proteínas.

### **2. METODOLOGIA**

#### 2.1. Manutenção do fungo

Os isolados de *T. harzianum* e *Rizoctonia solani*, da Coleção do Laboratório de Enzimologia - UFG, serão mantidos com repiques periódicos em meio MYG e estocado a 4°C.

#### 2.2 – Produção de Enzimas

Esporos ( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) dos isolados de *Trichoderma harzianum*, serão inoculados em um frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio TLE suplementado com 0,5% de parede celular isolada e purificada de *Rizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium* sp Os frascos serão incubados em agitador rotatório a 28°C e velocidade de 120 rpm. Após 48 horas de incubação o sobrenadante será coletado e utilizado com fonte de proteínas.

#### 2.3 - Análise de Proteoma/Eletroforese Bidimensional

Amostras do sobrenadante de cultura obtidos como descrito acima são liofilizadas e ressuspensas com água para um volume de 5ml e armazenadas em freezer para posterior análise da expressão das proteínas em eletroforese bidimensional. Para

análise em eletroforese bidimensional as amostras serão precipitadas com ácido Tricloacético e acetona e após precipitação, é adicionado tampão de lise e aplicadas em filtetes contendo anfólitos com variação de pH de 3-10 e a focalização isoeletrica será desenvolvida a 400Volts por 6 horas. Posteriormente os filtetes serão transferidos para um gel SDS-PAGE 12% para a segunda dimensão a 80-100 Volts por 3 horas. As proteínas serão visualizadas por coloração com azul de Coomassie G250 coloidal. Padrões de pl e massa molecular serão utilizados para a identificação das proteínas. Os spots diferenciais serão analisados através de espectrometria de massa

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os experimentos foi determinada a quantidade de proteínas totais bem como a determinação das enzimas: xilanases, celulasas, glucanases, amilases, lipases, endoglucanases, N-acetil-glicosaminidases, fosfatase ácida e fosfatase alcalina. A indução com parede de *Macrophomina phaseolina* apresentou maior atividade de fosfatase ácida em relação às outras induções e o controle. A indução com parede celular de *Fusarium* sp apresentou maior atividade de glucanase em relação às outras fontes e o controle. Os perfis diferenciais das proteínas secretadas nos diferentes meios de indução e o controle foram analisados por eletroforese uni (SDS-PAGE 12%) e bidimensional mostram um perfil diferencial da expressão de proteínas.

### 4. CONCLUSÃO

A fonte de Indução de proteínas é fator importante na expressão diferenciada de proteínas, sobretudo aquelas envolvidas durante o micoparasitismo.

A análise em gel bidimensional revela proteínas que são diferencialmente expressas nas fontes indutoras testadas (a) e que não estão presentes em condições de ausência de indutor. Essas proteínas serão recortadas do gel e serão submetidas em espectrômetro de massas com posterior identificação das seqüências de aminoácidos dos peptídeos em bancos de dados.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (ed.) *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor & Francis Ltda. 1998. V.2. p. 153-172.

HERRERA-ESTRELLA, A & CHET, I (1998). Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In **Agriculture Biotechnology** 174 (3): 1055-1059

HARMAN, G.E.(2000) Myths and Dogmas of Biocontrol. **Plant Disease** 84 (4): 377-393.

KUBICEK, C.P.; MACH, R.L.; PETERBAUER C.K.; LORITO, M. (2001). *Trichoderma*: From genes to Biocontrol. **Journal of Plant Pathology** 83 (2): 11-23

**FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq**

---

MONTEIRO.V.N; ULHOA.C.J. Diversidade de enzimas extracelulares produzidas por *Trichoderma harzianum* durante indução com diferentes paredes paredes de fitopatógenos In:III CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG

<sup>1</sup> Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas/UFG. [vnmonteiro@bol.com.br](mailto:vnmonteiro@bol.com.br)

<sup>2</sup> Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas/UFG. [ulhoa@icb.ufg.br](mailto:ulhoa@icb.ufg.br)