

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11**

**Método de purificação de uma  
endoquitinase de *Trichoderma  
harzianum* com atividade sobre  
a parede celular de fungos  
fitopatogênicos**

Luzia Helena Corrêa Lima  
Janice Lisboa de Marco  
Paulo Roberto Queiroz  
Cirano José Ulhoa  
Carlos Roberto Felix

Brasília, DF  
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

### **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

[e.mail:sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

### **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Felisberto de Almeida

Normalização bibliográfica: Sérgio Souza Santos

Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

### **1ª edição**

1ª impressão (2001): tiragem 150 exemplares.

### **Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; QUEIROZ, P. R.; ULHOA, C. J.; FELIX, C. R. **Método de purificação de uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* com atividade sobre a parede celular de fungos fitopatogênicos.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 32p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11).

ISSN 1676 - 1340

1.Controle biológico 2.Enzimas hidrolíticas 3.*Trichoderma*  
I.Título II.Série III.De Marco, J. L. IV.Queiroz, P. R. V.Ulhoa, C. J. VI.Felix, C. R.

CDD 632.96

# Introdução

O gênero *Trichoderma* é natural do solo, especialmente em solos orgânicos, e pode viver como saprófita ou como micoparásita necrotrófico, sendo eficaz no controle de vários fungos fitopatogênicos tais como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (Melo & Azevedo, 1998). Desde o trabalho pioneiro de Weindling & Fawcett (1936) sobre o uso de linhagens de *Trichoderma* no controle de doenças causadas em citros por *Rhizoctonia solani*, o potencial desse fungo para o uso em controle biológico (Chet, 1987; Melo, 1990; Melo, 1995; Melo & Azevedo, 1998) tem sido bastante pesquisado.

O micoparasitismo reflete a ação definida pelo ataque direto do fungo parasita à estrutura do fungo hospedeiro, estabelecendo uma relação nutricional que favorece a existência do parasita. Entre os modos de ação, o micoparasitismo é o que mais se destaca, pela complexidade e número de etapas envolvidas. Estas incluem o reconhecimento do alvo pelo antagonista, a transmissão de sinais que resulta na interação entre antagonista e fitopatógenos, a indução e produção de metabólitos (enzimas) pelo antagonista e a digestão da célula alvo. Dentro deste contexto, merece destaque o fato de as células fúngicas serem protegidas pela parede celular, uma estrutura rígida que, além de proteger a célula, exerce a função de seletora de fluxo de material. Ainda que vista como uma estrutura estática, a parede celular está sempre sendo remodelada durante o crescimento da célula, o que influencia os processos de interação antagonista-hospedeiro.

No processo de micoparasitismo, a primeira barreira encontrada pelo fungo antagônico é a parede celular, cuja função primordial é de proteção, permitindo a seletividade de moléculas. É uma estrutura bastante complexa, consistindo basicamente de carboidratos, os quais estão na maioria na forma de polissacarídeos (80% a 90%), tais como as glucanas e quitina. O restante é composto de proteínas, lipídios, íons inorgânicos e, algumas vezes, de quantidades razoáveis de pigmentos (melanina e caroteno).

A quitina é um dos componentes mais importantes da parede celular de fungos. Possui uma estrutura formada por moléculas de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, resultando em cadeias lineares (Stirling et al., 1979; Ballou 1982; Cabib et al., 1982; Jeuniaux 1966). Nos organismos é encontrada na forma de fibras associadas a proteínas, lipídeos



ou a outros açúcares (Stirling et al., 1979). É um biopolímero linear e insolúvel em água, sendo abundantemente encontrado no exoesqueleto dos invertebrados que vivem no mar (lagostas, caranguejos e outros crustáceos), nos insetos e na parede celular de fungos e de algumas algas. Análises de difração de raio X revelaram três formas de interação, intercadeias das moléculas de quitina ( $\alpha$ -quitina,  $\beta$ -quitina, e  $\gamma$ -quitina), que são estabilizadas por meio de pontes de Hidrogênio. Dentre estas, apenas a  $\alpha$ -quitina é encontrada na parede celular de fungos. Esse polímero consiste em cadeias antiparalelas de poli-N-acetil-D-glicosamina, estabilizadas por pontes de hidrogênio inter e intracadeias. A unidade estereoquímica dessa forma é a quitobiose (N,N'-diacetilquitobiose). As cadeias associadas por meio das pontes de hidrogênio entre as aminas de uma cadeia e as carbonilas da cadeia adjacente conferem insolubilidade à quitina na água e formação de fibrilas (Cabib, 1987). Com relação às formas  $\beta$ -quitina e  $\gamma$ -quitina, elas não são importantes no processo de interação entre fungos, já que elas são encontradas apenas em organismos aquáticos e em membranas peritróficas de insetos.

Chet (1992) descreveu os passos no processo de micoparasitismo por *Trichoderma* spp. O antagonismo inicia-se com a detecção do hospedeiro pelo antagonista que, provavelmente, ocorre em resposta à presença de estímulos químicos liberados pelo hospedeiro. O segundo passo seria o reconhecimento e ligação do micoparásita ao seu hospedeiro: crescer paralelamente ou “enrolar-se nele”. *R. solani* e *S. rolfsii* possuem, na parede celular, lectinas (glicoproteínas que aglutinam células e precipitam glicoconjugados) que se ligam a resíduos de galactose e fucose, presentes na parede celular de *T. harzianum* (Elad et al., 1983; Barak et al., 1985). Tais componentes conferem, assim, certa especificidade ao sistema antagônico (Sivan & Chet, 1992). A terceira etapa do processo antagônico seria, portanto, a ocasional degradação e lise da parede celular do microrganismo por enzimas quitinolíticas (quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase e N-acetilglucosaminidase) (Chet, 1992; Lima et al., 1997; Lima et al., 1999; Lima et al., 2000). Estudos de microscopia eletrônica de varredura revelaram a degradação da parede celular de *R. solani* e *S. rolfsii* por enzimas produzidas pelo isolado T<sub>6</sub> de *T. harzianum* dentro de um processo de micoparasitismo avaliado pelo método de culturas pareadas (Lima et al., 1997). Estas modificações estruturais foram caracterizadas por uma desorganização do citoplasma e uma hidrólise enzimática. Outras evidências da participação de enzimas quitinolíticas no processo antagônico foram obtidas de forma indireta. Na presença de quitina, *T. harzianum* produziu endoquitinases de 40-42 kDa

(Ulhoa & Peberdy, 1992) e 46 kDa (CHIT 46) (Lima et al., 1997; Lima et al. 1999) que, quando isoladas, afetaram drasticamente tanto o micélio de *Sclerotium rolfsii* quanto as estruturas de resistência, como os esclerócios deste fitopatógeno e uma quitinase de 37 kDa que afetou o micélio de *Crinipellis pernicioso* (De Marco et al., 2000).

A atividade quitinolítica induzida pela quitina de *T. harzianum* consiste de pelo menos sete enzimas, identificadas como sendo quatro endoquitinases (CHIT 52, CHIT 42, CHIT 33 e CHIT 31), duas N-acetilglucosaminidase (CHIT 102 e CHIT 73,) e uma exoquitinase (CHIT 40) (Haran et al., 1996).

Este trabalho consiste em descrever um método de purificação de uma endoquitinase (CHIT 46) do isolado T<sub>6</sub> de *T. harzianum* que possui potencial antagônico contra as paredes celulares dos fitopatógenos *R. solani* e *S. rolfsi*.

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	7
Introdução .....	8
Material e Métodos .....	10
Composição dos meios de cultura .....	10
Fungos utilizados (origem / manutenção) .....	11
Preparação de quitina regenerada .....	12
Preparo do reagente de dinitrossalicilato (DNS) .....	13
Dosagem de açúcar redutor .....	13
Produção de enzimas quitinolíticas .....	13
Ensaio para a determinação de atividades enzimáticas Quitinases ..	13
b-N-ACETIL-D-GLUCOSAMINIDASE .....	14
1,3 Glucanase .....	15
Purificação da quitinase .....	16
Caracterização eletroforética .....	17
Produção de anti-soro anti-quitinase .....	17
Imunodeteção de proteínas em membrana de nitrocelulose .....	18
Coloração de gel de poli(acrilamida) e membrana PVDF com solução coloidal de Coomassie Blue .....	18
Resultados .....	19
Purificação da quitinase produzida pelo <i>Trichoderma harzianum</i> isolado T <sub>6</sub> .....	19
Teste de adsorção em resinas .....	19
Cromatografia em coluna de DEAE - Sepharose .....	20

Imunogenicidade da quitinase do isolado T <sub>6</sub> de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	23
Indução da produção do anti-soro .....	23
Especificidade do anti-soro antiquitinase .....	23
<i>Cinética de produção da quitinase de 46 kDa pelo isolado T<sub>6</sub> de     Trichoderma harzianum</i> .....	24
Discussão .....	25
Conclusão .....	27
Referências Bibliográficas .....	27