

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Departamento de Patologia Molecular

**Produção de hidrolases pelo fungo *Dicyma pulvinata* ,
caracterização bioquímica de uma proteinase e
purificação parcial desta enzima**

Yara de Fátima Hamú

Brasília – DF
2007

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Departamento de Patologia Molecular

Produção de hidrolases pelo fungo *Dicyma pulvinata* ,
caracterização bioquímica de uma proteinase e purificação
parcial desta enzima

Yara de Fátima Hamú

Dissertação apresentada ao Departamento
de Patologia Molecular da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Patologia Molecular.

Brasília – DF
2007

Trabalho realizado no Laboratório de
enzimologia do Departamento de
Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
de Brasília.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Roberto Felix

Co-orientador:

Dr. João Batista Tavares da Silva

Dedico este momento da minha vida aos meus pais, Nagib e Nancy, por todos os esforços dispensados à minha formação profissional e principalmente à formação humana, bem como pelas horas de saudade, amor e incentivo. Ao meu esposo, Marcelo, pelo companheirismo e carinho, desde o início desta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos caminhos a mim concedidos, pela força nos momentos nos quais pensei desistir de continuar a caminhada, pela saúde e acima de tudo pela oportunidade de realizar meu maior objetivo.

Aos meus pais pelas presenças constantes em minha vida, assim como as dificuldades que passaram para que eu pudesse me formar e por toda dedicação a minha criação.

Ao Marcelo pelas inúmeras vezes que foi comigo à UnB (noites, finais de semanas e feriados), pelos momentos de compreensão quando fiquei ausente em casa e principalmente nos momentos de pressão em que o nervosismo predominava.

Aos meus irmãos, irmãs, sobrinhos e sobrinhas pela amizade, carinho e incentivo.

As inseparáveis e insuperáveis, Marísia e Margarete, pelas ajudas diárias, pelos momentos de descontração e acima de tudo pelos conselhos e abraços amigos.

A Janice pelas dicas, pelos bate-papos e pela ajuda imensurável durante estes anos.

Aos amigos Daniel, Félix Siqueira e Gil (MSU) pelas idéias trocadas, pelas várias vezes que me ajudaram nos experimentos e pelos momentos de risada. Pensou que eu ia me esquecer Gil, pelas incontáveis vezes que me salvou no computador.

Ao professor Edivaldo Ximenes pela convivência harmoniosa.

As estagiárias: Bia, Marly e Danielle pelos bons momentos e ajudas nos experimentos.

A Dona Conceição e a Fernanda pela limpeza do laboratório, pelas conversas amigas e descontração.

Aos membros da EMBRAPA pela parceria e confiança.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Carlos Roberto Felix e grande amigo, por ter me recebido tão bem na Enzimologia e ser meu orientador, pela confiança, apoio, compreensão e enorme paciência, meus eternos agradecimentos e muito obrigado por ter contribuído de forma tão significativa no meu profissionalismo, pela convivência agradável e amiga e claro pelos momentos de descontração (haja pedra...).

ÍNDICE

Índice	i
Abreviaturas e símbolos	iv
Índice de figuras	v
Resumo	viii
Abstract	ix
INTRODUÇÃO	1
1 – Heveicultura.....	1
2 – Controle Biológico.....	6
3 – Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico.....	8
3.1 – β -Glucanases.....	8
3.2 – Quitinases.....	9
3.3 – Amilases.....	10
3.4 – Proteases.....	10
OBJETIVO	12
MATERIAIS E MÉTODOS	13
1 – Origem e manutenção das cepas.....	13

2 – Formação de halos.....	13
3 – Produção de enzimas.....	14
4 – Ensaio enzimáticos.....	14
4.1 – Ensaio para β -1,3-glucanase.....	14
4.2 – Ensaio para quitinase.....	15
4.3 – Ensaio para amilase.....	16
4.3.1 – Atividade dextrinizante.....	16
4.3.2 – Atividade sacarificante.....	16
4.4 – Ensaio para protease.....	17
5 – Cinética e hidrólise de caseína.....	17
5.1 – Determinação do pH ótimo das enzimas.....	17
5.2 – Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade das enzimas...	17
6 – Purificação parcial da protease.....	18
6.1 – Concentração das amostras de protease.....	18
6.2 – Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose.....	18
6.3 – Cromatografia em coluna de SP-Sepharose.....	18

6.4 – Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose.....	18
6.5 – Fracionamento do sobrenadante do meio de cultura com sulfato de amônio.....	18
7 – Caracterização eletroforética de proteases.....	19
7.1 – Eletroforese desnaturante.....	19
7.1.1 – Revelação de proteínas no gel.....	19
7.1.1.1 – Coloração com Prata.....	19
8 – Técnicas de dosagem.....	21
8.1 – Dosagem do açúcar redutor.....	21
8.2 – Dosagem de proteínas.....	21
RESULTADOS.....	22
1 – Formação de halos pelos isolados CEN 62 e CEN 93 de <i>Dicyma pulvinata</i>	22
2 – Produção de enzimas hidrolíticas por isolados de <i>Dicyma pulvinata</i>	25
3 – Cromatografia da protease presente no sobrenadante concentrado dos isolados CEN 62 e CEN 93 de <i>Dicyma pulvinata</i>	39
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES.....	52
PERSPECTIVAS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cm	centímetro
CM	carboximetil
g/L	gramas/litro
kDa	kilodaltons
L	litro
M	molar: mol/L
m	metro
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
PA	persulfato de amônia
p/v	peso/volume
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N' - tetrametil etilenodiamina
μL	microlitro
μmol	micromol
U	unidade de atividade enzimática
v	volume
V	volts
v/v	volume/volume
°C	graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plantio de <i>Hevea brasilienses</i>	4
Figura 2: Floresta de <i>Hevea brasilienses</i> em fase de produção comercial de borracha..	4
Figura 3: Produção de látex pela <i>Hevea brasilienses</i>	5
Figura 4: Folhas de seringueira: sadia e contaminada.....	5
Figura 5: Halo de hidrólise de celulose.....	22
Figura 6: Halo de hidrólise de amido.....	22
Figura 7: Halo de hidrólise de β -glucana.....	23
Figura 8: Halo de hidrólise de quitina.....	23
Figura 9: Halo de hidrólise de caseína.....	24
Figura 10: Atividade de β -1,3-glucanase.....	25
Figura 11: Atividade de quitinase.....	26
Figura 12: Atividade de amilase dextrinizante nos sobrenadantes.....	27
Figura 13: Atividade de amilase dextrinizante nos micélios.....	28
Figura 14: Atividade de amilase sacarificante nos sobrenadantes.....	29
Figura 15: Atividade de amilase sacarificante nos micélios.....	30

Figura 16: Variação de pH no meio de cultura.....	31
Figura 17: Atividade caseinolítica no sobrenadante do meio de cultura.....	32
Figura 18: Atividade caseinolítica no concentrado do isolado CEN 62.....	33
Figura 19: Atividade caseinolítica no concentrado do isolado CEN 93.....	34
Figura 20: Efeito do pH na atividade caseinolítica dos dois isolados.....	35
Figura 21: Efeito da temperatura na atividade caseinolítica dos dois isolados.....	36
Figura 22: Efeito da temperatura no isolado CEN 62 pré-incubado por vários tempos.	37
Figura 23: Efeito da temperatura no isolado CEN 93 pré-incubado por vários tempos.	38
Figura 24: Perfil cromatográfico em DEAE-Sepharose do isolado CEN 62.....	39
Figura 25: Perfil cromatográfico em DEAE-Sepharose do isolado CEN 93.....	40
Figura 26: Perfil cromatográfico em SP-Sepharose do isolado CEN 62.....	41
Figura 27: Perfil cromatográfico em SP-Sepharose do isolado CEN 93.....	42
Figura 28: Perfil cromatográfico em DEAE-Sepharose pós SP-Sepharose do isolado CEN 93.....	43
Figura 29: Perfil cromatográfico em DEAE-Sepharose pós SP-Sepharose do isolado CEN 62.....	44
Figura 30: Gel de poliacrilamida do isolado CEN 93.....	45
Figura 31: Gel de poliacrilamida do isolado CEN 62.....	46

Figura 32: Gel de poliacrilamida dos isolados CEN 62 e CEN 93..... 47

RESUMO

O fungo *Dicyma pulvinata* (Deuteromycotina: Hyphomycete), apresenta grande potencial de uso em biocontrole de doenças de plantas, e tem sido encontrado em lesões induzidas pelo fungo *Microcyclus ulei* (Ascomycete), em folhas de seringueira (*Hevea* spp.). Esta doença, mal-das-folhas da seringueira, constitui fator limitante para a produção de látex e para a expansão da cultura no Brasil e em outros países da América Latina. O controle biológico do *M. ulei*, pelo fungo *D. pulvinata*, vem sendo apontado como promissor, pois o antagonista coloniza estromas do fitopatógeno, impedindo sua esporulação e, conseqüentemente, reduzindo o desfolhamento das plantas e a taxa de inóculo para reinfecções. É atualmente aceito que enzimas hidrolíticas, principalmente quitinases, β -glucanases e proteases produzidas por fungos com capacidade antagônica hidrolisam componentes da parede celular de fungos fitopatogênicos causando assim, sua destruição. Acredita-se, portanto, que agentes de biocontrole com maior capacidade de produção de enzimas micolíticas apresentem maior capacidade de controle.

Assim, variantes de *D. pulvinata* – isolados CEN 93 (CG 774) e CEN 62 (CG 683) que apresentam potenciais de controle diferenciados foram avaliados quanto à produção de hidrolases; adicionalmente foi procedida a caracterização bioquímica de uma proteinase e a purificação parcial desta enzima, para cada isolado.

Para o isolado CEN 62, houve uma melhor atividade proteolítica com 192 h e para o isolado CEN 93, com 240 h de crescimento em meio de cultura. Após a detecção de atividade proteolítica, estas foram investigadas quanto aos efeitos do pH e temperatura. O pH ideal foi igual a 8,0 e a temperatura ideal entre 25° e 50°C para os dois isolados de *D. pulvinata*. As amostras com atividade proteolítica foram concentradas e submetidas a cromatografias de troca iônica. Os isolados CEN 62 e CEN 93 apresentaram cinco picos de proteínas e as frações com atividades proteolíticas foram reunidas, concentradas e recromatografadas em outras colunas de troca iônica e, então, seu perfil eletroforético estabelecido. Verificou-se que todas as amostras resultantes dos processos cromatográficos apresentaram mais de uma espécie protéica, demonstrando que as proteases foram purificadas apenas parcialmente.

ABSTRACT

The fungus *Dicyma pulvinata* (Deuteromycotina: Hyphomycete) shows strong biocontrol potential for plant diseases, and has been found in lesions caused in plants by *Microcyclus ulei* (Ascomycete), the agent of the South American Leaf Blight (SALB). This disease of the rubber tree (*Hevea* spp.), is a limiting factor for latex production and for expansion culture in Brazil and other countries of Latin America. The biological control of *M. ulei* by *D. pulvinata*, is currently considered as promising, because it colonizes strums of phytopathogen, preventing their sporulation and, consequently, reducing defoliation and inoculum rate reinfection. It is well accepted that hydrolytic enzymes, mainly chitinase, β -glucan and protease produced by fungi with antagonistic capability hydrolyse the cell wall components of phytopathogenic fungi. It is therefore, believed that control agents with higher capacity of micolytic enzymes production show also higher capacity of biological control.

So, variants of *D. pulvinata* – isolates CEN 93 (CG 774) and CEN 62 (CG 683) showing distinct capacity of *M. ulei* control were evaluated for their capacity to produce hydrolases. In addition, proteases produced by these two isolates were partially purified and characterized.

The enzyme levels present in the culture filtrates indicated that the isolate CEN 62 had higher capacity of proteolytic enzymes production. The optima pH and temperature for each protease were about 8.0, and 25°C - 50°C, respectively. Ion exchange chromatographies of proteolytic enzyme samples from both isolates resulted in the separation of several protein peaks. Poliacrylamide gel electrophoresis indicated that all the protein fractions having proteolytic activity were partially purified only.

INTRODUÇÃO

1 – Heveicultura

O gênero *Hevea* pertence à família Euphorbeaceae e divide-se atualmente em 11 espécies destacando-se a *H. brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss) Müell. Arg. com grande potencial para produção de borracha natural. Estas plantas possuem folhas compostas, flores pequeninas, com fruto em uma grande cápsula com sementes ricas em óleo (Figuras 1 e 2). Temperatura e umidade relativa do ar são os elementos do clima que mais exercem influência nos diversos estágios de desenvolvimento da planta. Assim, locais com temperatura média anual abaixo de 20 graus centígrados e umidade excessiva são os menos indicados, por proporcionarem condições ideais à incidência de doenças que limitam a cultura. Ainda, dado o desenvolvido sistema radicular, recomenda-se que o plantio da seringueira seja em solos de textura média e com boa profundidade, evitando-se sempre terrenos sujeitos a inundações periódicas, argilosos e mal drenados. As áreas planas são mais adequadas e economicamente vantajosas para a implantação e exploração de seringais de cultivo. Em áreas de relevo ondulado, recomenda-se o plantio da média encosta para cima, e em curvas de nível. Sempre que possível, as linhas de plantio devem ser traçadas no sentido norte/sul, a fim de receberem intensa insolação e evitar o auto-sombreamento (Marques, 2000).

O látex produzido pela árvore é uma suspensão aquosa contendo 30 a 40% de sólidos em forma de partículas de borracha visíveis em ultramicroscópio. Com propriedades únicas entre os produtos naturais poliméricos, a borracha natural combina elasticidade, plasticidade, resistência ao desgaste (fricção), propriedades de isolamento elétrico e impermeabilidade a líquidos e gases (Gonçalves et al., 1990) (Figura 3).

As grandes áreas de produção comercial de borracha natural concentram-se no sudeste asiático, destacando-se a Malásia, Indonésia e Tailândia como maiores produtores. A produção brasileira, ainda que tenha apresentado acréscimos nos últimos anos, só responde por 18% das necessidades do país, sendo o restante importado de outros centros produtores, com reflexos negativos na nossa balança comercial (Marques, 2000).

A área tradicional de cultivo da seringueira, no Brasil, abrange a Amazônia Tropical Úmida, Mato Grosso e Bahia. Em áreas não-tradicionais, a seringueira é cultivada nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. No Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, estão

concentradas as maiores plantações do estado de Minas Gerais, alcançando produtividade de, aproximadamente, 1.500 kg de borracha seca/ha/ano. Do ponto de vista social, a heveicultura é muito importante, principalmente na fixação do homem no campo, pois produz o ano todo (Gasparotto et al., 1990).

Em face da crescente necessidade de borracha para atender à expansão da indústria automobilística e buscando fugir da dependência do produto asiático, os norte-americanos solicitaram e obtiveram do governo brasileiro a concessão de 1.200.000 hectares de terras, às margens do rio Tapajós, no Estado do Pará, para o plantio de seringueiras. Em 1928, a Companhia Ford estabeleceu os primeiros plantios em Fordlândia. O material plantado foi obtido de sementes da região do rio Solimões e Machado, próximo a Belém. A tentativa foi, porém, frustrada, em razão da ocorrência freqüente do “mal das folhas” provocado pelo fungo *Microcyclus ulei* (P.Henn.) Arx. (Figura 4). Fracassado o empreendimento em Fordlândia, suspenso em 1933, começaram então os plantios em Belterra que sofreram, também, com a incidência da doença. No total foram plantados 6.570 hectares na região, utilizando-se também clones do Oriente introduzidos em princípios de 1934 (Gonçalves, 1995).

A seringueira (*Hevea* spp.) é uma das espécies perenes mais afetadas por fitopatógenos. Os fungos são responsáveis por quase 100% das enfermidades que atacam a cultura. Entre eles, destaca o *M. ulei*, que na fase imperfeita, ou conidial, é denominado *Fusicladium macrosporum*, agente causal do mal-das-folhas. Esta doença é considerada o principal fator limitante da produção de látex e da expansão da heveicultura no Brasil e em outros países da América Latina (Junqueira & Gasparotto, 1991; Gasparotto et al., 1997).

O “mal-das-folhas” é uma das mais destrutivas doenças da seringueira, gerando perdas de até 100% na produção (Gasparotto et al., 1990). O patógeno, *M. ulei*, se dissemina principalmente sob a forma de conídios, que em condições favoráveis de temperatura e umidade, germinam, penetram o 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 patógenos secundários (Gasparotto et al., 1984).

As primeiras seleções para resistência ao “mal das folhas”, no Brasil, foram realizadas pela Companhia Ford. Durante os anos de 1942 e 1945, o programa se expandiu, sendo conduzido em cooperação entre a própria Companhia Ford, o então recém criado Instituto Agrônomo do Norte (IAN) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. O primeiro passo foi a seleção de matrizes que haviam mostrado resistência à doença em Fordlândia (Gonçalves, 1995).

No Brasil, para o controle da doença (mal-das-folhas) da seringueira, tem-se utilizado a seleção de clones resistentes, cultivos de seringueiras em áreas consideradas de escape, utilização de produtos químicos, enxertia-de-copa e controle biológico, como por exemplo, a utilização de fungos parasitas de pragas (Tavares, 2001).

O uso de clones resistentes e produtivos representa uma medida considerável de controle ao mal-das-folhas. Diversos clones mostram susceptíveis ao *M. ulei*, pois podem apresentar um comportamento diferente de uma localidade para outra (Gasparoto et al., 1997).

As áreas de escape são aquelas em que o plantio é feito em locais desfavoráveis ao patógeno. A ausência dos mal-das-folhas numa região não é suficiente para enquadrá-la como área de escape. O clima, a virulência ao patógeno, a susceptibilidade e densidade do hospedeiro, a disponibilidade do inóculo, a localização topográfica do plantio e o período de troca das folhas do clone, influenciam na ocorrência da doença (Gasparoto et al, 1997).

O uso de fungicidas tem sua eficiência comprovada para o controle do mal-das-folhas por vários autores (Santos & Pereira, 1985; Brignani Neto et al., 1991). Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos pode originar uma série de problemas, como o surgimento de linhagens resistentes, o que diminui a eficiência do tratamento (Azevedo, 1991).

No processo de enxertia-de-copa, enxerta-se um clone de copa altamente resistente sobre o tronco de um clone muito produtivo, com o intuito de promover a combinação entre resistência e produtividade, mas podem alterar a produção do látex (Pereira, 1992).

Técnicas alternativas de controle do mal-das-folhas utilizando o controle biológico poderá ser a única forma capaz de controlar esta doença (Bettiol, 2003). O hiperparasita *D. pulvinata* tem sido apontado como um agente promissor no controle do *M. ulei* (Junqueira et al., 1989; Delmandi, 2002). Esse fungo é capaz de colonizar lesões estromáticas causadas por *M. ulei*, destruindo tanto a fase ascógena como a conidial do patógeno e provocando a redução do desfolhamento das plantas e da taxa de inóculo para reinfecções (Junqueira e Gasparotto, 1991).



Figura 1: Viveiro de chão, após o plantio de *Hevea brasiliensis*.



Figura 2: Floresta de seringueiras (*Hevea brasiliensis*) em fase de produção comercial de borracha, na região de abrangência do Arenito Caiuá, noroeste do Paraná.



Figura 3: Produção de látex pela *Hevea brasiliensis*, ainda na forma líquida.



Figura 4: Folhas de seringueira. Sadia e atacada pelo *Microcyclus ulei* (Mal-das-folhas), respectivamente.

2 – Controle Biológico

Em conceito mais amplo, o controle biológico fundamenta-se no fenômeno natural da associação entre as espécies e pode ser definido como sendo “a ação de parasitas predadores e patógenos que mantêm relativamente baixa a densidade populacional de pragas, ao contrário do que ocorreria em sua ausência” (*DeBach*, 1964). Costuma-se classificar o controle biológico sob dois aspectos: o natural, que mantém sem qualquer influência humana as criaturas em perfeito equilíbrio dentro de seus habitats; e o aplicado, que consiste na introdução e manipulação de inimigos naturais pelo homem (*Ridgway*, 1981; *Melo*, 1991).

O controle biológico fundamenta-se nas interações antagônicas entre as espécies, entretanto os mecanismos envolvidos não são ainda suficientemente conhecidos. As interações mais estudadas e melhor caracterizadas são as que ocorrem entre fungos fitopatogênicos e seus antagonistas (*Chet*, 1992; *Haran et al.*, 1996). Nelas, o fungo antagonista interfere na vida do fitopatógeno das seguintes maneiras: a) por **competição** – que reflete a luta pela aquisição de um recurso indispensável (espaço físico, nutriente, microelementos, água ou luz); b) por **antibiose** - que representa a hostilidade química (ação de substâncias e antibióticos voláteis ou não voláteis) com eliminação de um dos contendores; e c) **micoparasitismo** - que representa a hostilidade química (antibiose) e ação canibal (digestão por enzimas hidrolíticas, como quitinases, proteases, glucanases e lipases), resultando na eliminação de um e no aproveitamento dos restos celulares pelo sobrevivente. Dentre os três processos, o micoparasitismo é o que mais se destaca, pela complexidade e número de etapas envolvidas. Estes 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 das células fúngicas serem protegidas pela parede celular, uma estrutura rígida que além de proteger a célula exerce a função 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 necessariamente influencia os processos de interação antagonista-hospedeiro (*De Marco et al.*, 2000a).

O controle biológico é altamente desejável, mesmo quando associado a outros métodos, por promover menor impacto ambiental e desequilíbrio ecológico (*Bettiol*, 1991).

Em controle biológico de doença de plantas, destacam-se dois níveis associativos nos quais a afinidade é fundamental para a ocorrência das interações envolvidas: no primeiro nível, aparece a afinidade entre o patógeno e o vegetal, o que gera um estado fisiológico

(doença) a ser controlado; no segundo, destaca-se a afinidade do antagonista pelo fitopatógeno, afinidade esta que deve ser superior e reverter o estado gerado pela interação destacada anteriormente. As afinidades são representadas pelas capacidades de sobrevivência do antagonista e do patógeno em um mesmo nicho ecológico, da conversão dos substratos disponíveis, do reconhecimento celular mútuo e dos poderes destrutivos e defensivos dos microrganismos interagentes. As duas primeiras propriedades são determinantes, ou seja, na ausência delas não existiria a patogenicidade, nem a capacidade de biocontrole. Por sua vez, o sucesso do controle biológico é diretamente proporcional ao poder destrutivo do microrganismo antagonístico e inversamente proporcional ao poder de escape do patógeno às agressões impostas. Em ambos os casos, as intensidades são graduais e a virulência dos patógenos não é uma escolha autônoma. O controle deles dependerá, portanto, da disponibilidade de microrganismos antagonísticos que exibam as melhores propriedades em suprimir o desenvolvimento de patógenos (*Deacon & Berry, 1992*).

Experimentos conduzidos no laboratório (*Elad et al., 1984; Lima et al., 1997*) e experimentos pilotos conduzidos no campo (*Latunde-Dada, 1993*) mostraram claramente que fungos antagonísticos atacam o micélio de fungos fitopatogênicos. Ainda que os mecanismos responsáveis não sejam devidamente conhecidos, inúmeras evidências, inclusive aquelas obtidas com mutantes deficientes (*Chernin et al., 1995*), indicam que o micoparasitismo envolvendo enzimas hidrolíticas assume papel fundamental no processo (*Inbar & Chet, 1994; Lima et al., 1997*).

A viabilidade celular depende da integridade dos componentes da parede celular, a qual funciona como barreira seletiva ante as pressões físico-químicas exercidas pelo meio ambiente em que o microrganismo sobrevive. Tal barreira é o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos. As enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar os componentes da parede celular desempenham, portanto, papel fundamental no processo antagonístico (*Chet & Baker, 1980; Elad et al., 1983; Benhamou & Chet, 1993; Haran et al., 1996*).

Considerando o papel exercido pelas enzimas hidrolíticas no processo antagonístico, é esperado que microrganismos superprodutores de hidrolases apresentem capacidade antagonística superior (*Timmis, 1994*).

3 – Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico

Enzimas são macromoléculas protéicas responsáveis pela aceleração de reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais. Em meados do século XX, as enzimas começaram a ser extraídas das células produtoras para utilização em produtos e processos industriais. As enzimas passaram a substituir catalisadores químicos nas indústrias, fato este favorecido pelas condições de pH e temperatura. Atualmente os catalisadores biológicos têm modificado inúmeros setores industriais. Devido a sua presença em todos os seres vivos, dos quais podem ser extraídas e aplicadas, livres ou imobilizadas, em sistemas diferentes daqueles que as originou. Cerca de 75% das enzimas aplicadas industrialmente são hidrolases as quais depolimerizam substâncias naturais. Dentre as hidrolases, as proteases dominam o mercado, representando 40% de todas as enzimas comercializadas. O emprego de enzimas em produtos e processos industriais não apresenta perigo para a saúde de humanos e animais e nem para o meio ambiente, se os cuidados forem seguidos. São facilmente degradadas e assimiladas pela cadeia alimentar, não contaminam lençóis freáticos, não são carcinogênicas e não poluem o ambiente. Ao contrário, pela sua especificidade, evitam que extremos de temperatura, de pH e de pressão sejam usados em vários processos industriais, economizando energia, equipamentos e deixando de expor trabalhadores a essas condições de trabalho (*Pietro & Said, 2004*).

3.1 – b - glucanases

As β - glucanas são constituídas de homopolímeros de D - glicose unidos por ligações β -1,3, β -1,4 e β -1,6. Embora muitos fungos possuam a capacidade de sintetizar β -glucanas para o espaço extracelular ou citoplasmático, elas estão localizadas normalmente na parede celular. As β - glucanas sintetizadas pelos fungos relacionam-se com tamanho, tipo de estrutura, propriedades físicas e químicas. No entanto, a natureza e a localização das β -glucanas da parede sugerem que elas podem ser degradadas e utilizadas como fontes nutricionais, depois da exaustão de nutrientes externos ou por mudanças na composição da parede celular durante morfogênese (*Pitson et al., 1993; Haran et al.; 1996*).

As β -glucanas são hidrolisadas por β -glucanases, as quais podem atuar através de dois mecanismos possíveis, identificados pelos seus produtos de hidrólise: *exo- β -glucanases* - hidrolisam a cadeia de β -glucanas de forma sequencial a partir da extremidade não-redutora,

liberando glicose como produto de hidrólise ou endo- β -glucanases - clivam as ligações do tipo β de maneira aleatória liberando como produto de hidrólise pequenos oligossacarídeos. Podem ainda ser divididos em dois grupos de acordo com o produto de hidrólise: o grupo de enzimas que liberam principalmente oligossacarídeos durante a hidrólise e, o grupo de enzimas que, rapidamente produzem glicose e dissacarídeos (*De Marco, 1999*).

3.2 – Quitinases

A quitina, um polímero de resíduos de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), unidos por ligações glicosídicas β -1,4, é encontrada nos organismos na forma de fibras associadas a lipídeos, a proteínas ou a outros açúcares, sendo um dos principais componentes da parede de fungos (*Stirling et al., 1979*).

Estudos realizados através de análises de difração de raios-X revelaram existir três formas (α , β e γ) de interação intercadeias das moléculas de quitina, as quais são estabilizadas através de pontes de H. A α -quitina é a forma mais comum, presente na parede celular de fungos e no exoesqueleto de artrópodes. A β -quitina apresenta estrutura diferente da α -quitina no que refere a sua capacidade de hidratação e é encontrada apenas em organismos aquáticos. A γ -quitina é encontrada apenas em membranas periotróficas de insetos, todas diferem entre si pelos tipos e formas de cadeias. A mais comum na natureza é a α -quitina, mas tanto a β -quitina quanto a γ -quitina tendem a ser convertidas em α -quitina (*Cabib, 1987*).

De acordo com a composição da parede celular de fungos, é importante reconhecer que a composição da parede não é fixa. De fato, ela pode mudar substancialmente em diferentes estágios do ciclo de vida, demonstrando assim que tanto a estrutura como a competição refletem a necessidade funcional de um fungo (*Deacon, 1997*).

Quitina é hidrolisada por enzimas que atuam nas ligações do tipo β -1,4. As características gerais dessas enzimas foram resumidas por *Sahai & Manocha (1993)*, em uma forma simplificada. Três tipos de enzimas quinolíticas foram descritas baseando-se nos produtos de hidrólise de quitina: a) exoquitinases – liberam somente diacetilquitobioses ou apenas quitobioses (dímeros de N-acetilglicosamina) de uma forma progressiva a partir da extremidade não redutora do polímero; b) endoquitinases – agem aleatoriamente liberando oligossacarídeos como quitotetrose, quitotriose e quitobiose; c) β -1,4-N-acetilglicosaminidases – são enzimas que hidrolisam os oligossacarídeos formando monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) a partir da quitobiose.

A nomenclatura acima foi revista por Harman et al. (1993) que propuseram, considerando a Nomenclatura Enzimática e trabalhos de purificação e caracterização das respectivas enzimas, uma simplificação: a) exoquitinases: (β -1,4-N-acetilglicosaminidases ou glicosaminidases) – liberam monômeros das extremidades não redutoras e necessitam de, no mínimo, uma quitobiose como substrato para atuarem; b) β -1,4-quitobiosidases – liberam unidades diméricas não redutoras e necessitam de, no mínimo, uma quitotriose como substrato para atuarem; c) endoquitinases – clivam aleatoriamente polímeros ou oligômeros e não reconhecem as extremidades não redutoras. Necessitam de, no mínimo, uma quitotetrose como substrato para atuarem.

3.3 – Amilases

O amido é um polímero de resíduos de glicose ligados uns aos outros através de ligações glicosídicas que são estáveis em pH alcalino, mas hidrolisadas em pH ácido. Dois tipos de polímeros estão presentes no amido: amilose e amilopectina. Amilose é um polímero linear constituído de até cerca de 6000 resíduos de glicose ligados por ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina consiste de pequenas cadeias lineares de 10 a 60 resíduos de glicose unidos por ligações α -1,6 (Buléon et al., 1998).

As amilases parecem não ter nenhum envolvimento nos processos antagônicos entre fungos. Porém, devido à ampla distribuição deste polímero de glicose, o mesmo pode ter de forma indireta, um papel importante na sobrevivência dos antagonistas (De Marco, 1999).

3.4 – Proteases

Enzimas degradativas que hidrolisam proteínas a peptídeos e aminoácidos e foram identificadas primeiramente por Rudolf Schoenheimer em 1942, como as enzimas chaves para manutenção da concentração do “estado estacionário” das proteínas envolvidas no metabolismo celular (Hershko & Cienchanover, 1982). Recentemente, proteases têm sido consideradas também como alvo para a manipulação de microrganismos com o objetivo de aumentar a capacidade de controle de fitopatógenos específicos (De Marco & Felix, 2002).

As proteases são proteínas ubiquitinosas, ou seja, são amplamente distribuídas na natureza. As enzimas atualmente comercializadas para uso industrial são de origem celular, mais especificamente, enzimas produzidas por microrganismos, plantas e animais. No

entanto, ainda que poucas espécies de microrganismos sejam produtoras de enzimas industriais, a grande maioria (90%) destas enzimas são de origem microbiana. Existe uma tendência a utilizar enzimas de microrganismos extremofílicos, já que tais enzimas apresentam características não convencionais e são, portanto, mais resistentes a situações desfavoráveis (*Haki & Rakshit, 2003*).

As proteases são classificadas de acordo com: tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relação evolucionária em conformidade com a estrutura (*Anwar & Saleemuddin, 1998*).

De acordo com a faixa de pH na qual apresentam maior atividade, as proteases podem, ainda, ser inicialmente classificadas em proteases ácidas, básicas e neutras. As ácidas são representadas principalmente pelas aspárticoproteases e possuem atividade na faixa de pH 2,0 – 6,0. As proteases neutras possuem atividade em pH neutro na faixa de 6,0 – 8,0 e incluem principalmente as cisteínoproteases, metaloproteases e algumas serinoproteases. Já as proteases alcalinas possuem maior atividade na faixa de pH de 8 – 13 e são representadas principalmente pelas serinoproteases (*Gupta et al., 2002; Rao et al., 1998*).

Podem ser divididas em dois grupos principais: as exopeptidases e as endopeptidases. As exopeptidases caracterizam-se por hidrolisarem ligações peptídicas próximas aos terminais carboxílicos (carboxipeptidases) e amina (aminopeptidases) do substrato. As carboxipeptidases podem ser subdivididas em serinoproteases, metaloproteases, cisteínoproteases, peptidil dipeptidases, dipeptidase e omegapeptidases. Já as aminopeptidases compreendem as dipeptidil peptidases e as tripeptidil peptidases. Considerando os mecanismos de catálise, as endopeptidases compreendem quatro grupos de enzimas que hidrolisam preferencialmente ligações internas distanciadas dos terminais amina e carboxilas: serinoproteases (*Barret, 1994; Brenner, 1998; Govind et al., 1981; Lindberg et al, 1981; Phadatare et al., 1997*); aspárticoproteases (*Fitzgerald et al., 1990; Sielecki et al., 1991*); cisteínoproteases (*Barret, 1994*) e metaloproteases (*Barret, 1994; Barret, 1995; Weaver et al., 1977*).

OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a capacidade de produção de hidrolases – β -1,3-glucanase, quitinase, amilase e protease - de dois isolados (CEN 62 e CEN 93) do fungo *D. pulvinata*, com diferentes capacidades antagônicas contra o fitopatógeno *M. ulei* - o causador do mal-das-folhas da seringueira e realizar a caracterização bioquímica das proteases e a purificação destas enzimas.

Como objetivos específicos foram propostos:

1 – Verificar a capacidade de hidrólise de diferentes substratos via halo de hidrólise em meio sólido contendo β -1,3-glucana, ou celulose, ou quitina, ou amido, ou caseína;

2 – Determinar o perfil de produção de hidrolases em meio sintético contendo quitina, amido e proteínas;

3 – Verificar o efeito da temperatura e pH nas atividades das proteases;

4 – Purificar por processos cromatográficos em coluna, as proteases produzidas pelos dois isolados de *D. pulvinata*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Origem e manutenção das cepas

Foram utilizados, neste estudo, dois isolados [CEN 62 (CG 683) e CEN 93 (CG 774)] de *D. pulvinata*, os quais foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia do Núcleo Temático de Controle Biológico (NTCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e são procedentes, respectivamente, de Belém (PA) e Ponte de Lacerda (MT). As linhagens pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Plantas Daninhas e Fitopatógenos da Unidade, foram semeadas em meio-seletivo básico Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Melo, 2006) e Maltose-Yeast-Growth (MYG) e mantidas à 25°C.

Ó Composição dos meios de cultura

BDA

Glicose	1,0% (p/v)
Ágar	2,5% (p/v)
Caldo de batata cozida	10 g batata/100 mL de água fervente/20 minutos
	pH 6,0

MYG

Extrato de malte	0,50% (p/v)
Extrato de levedura	0,25% (p/v)
Glicose	1,0% (p/v)
Ágar	2,0% (p/v)
	pH 6,2

2 – Formação de halos

Os isolados (CEN 62 e CEN 93) de *D. pulvinata* foram repicados em placas de Petri contendo meio sintético, 0,02% de glicose, 1,8% de ágar, 20 mM de citrato de sódio e 0,5% de amido solúvel, ou caseína solúvel, ou β -Glucana, ou CM celulose, ou quitina. A incubação ocorreu à temperatura ambiente de 25°C durante 5 dias. Posteriormente, as placas contendo colônias foram submetidas a colorações específicas e os halos formados por cada isolado

foram então avaliados como indicativos da capacidade de crescimento em diferentes substratos.

Para a coloração do amido, as placas foram submetidas a vapor de cristais de iodo até o aparecimento dos halos. Para a coloração da caseína, as placas foram coradas com Commassie blue e para β -Glucana ou CM celulose ou quitina, as placas foram coradas com vermelho Congo até o aparecimento dos halos (aproximadamente 20 minutos).

3 – Produção de enzimas

Os isolados de *D. pulvinata* foram crescidos em volumes de 200 mL de meio sintético ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L; K_2HPO_4 , 0,6 g/L; KCl, 0,15 g/L; NH_4NO_3 , 1 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6,0 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4,0 mg/L; CoCl_2 , 2,0 mg/L; pH 5,5) contendo 0,025% de glicose e 0,5% de β -Glucana, ou quitina, ou amido de batata, ou caseína e autoclavados a 120°C por 20 minutos. Após a inoculação com uma suspensão de esporos ($8,5 \times 10^7$ esporos/mL), incubou-se a 28°C, sob agitação (150 rpm) por até 14 dias. As amostras do sobrenadante de cultura foram coletadas por filtração com papel de filtro em diferentes horas de crescimento, e utilizadas para a determinação das atividades de hidrolases.

Para a preparação do meio sintético contendo caseína, o meio foi autoclavado sem caseína e esta foi esterilizada por 20 minutos sob luz ultravioleta (placa colocada a 1 m da lâmpada germicida) e então, adicionada ao meio sintético previamente autoclavado e resfriado.

4 – Ensaio enzimáticos

4.1 – Ensaio para b-1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanase foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor liberado da laminarina. Em 250 μL de laminarina 1% diluída em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, foram adicionados 125 μL de enzima. A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 1,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS). Esta mistura foi então aquecida em banho fervente por 5 minutos e a absorbância a 550 nm, determinada em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 11/ Bio). A quantidade de açúcar redutor formado foi quantificada espectrofotometricamente, utilizando-se uma curva padrão

construída com glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor por minuto.

4.2 – Ensaio para quitinase

O ensaio desta atividade foi feito quantificando o açúcar redutor, pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) usando quitina como substrato. O sistema de ensaio constituiu-se de 1,0 mL de enzima e 1,0 mL de quitina regenerada (0,5%) dissolvida em tampão acetado de sódio 50mM pH 5,2 (Molano *et al.*, 1977). O ensaio foi conduzido por 8 horas a 37°C. Após esse período, a 200 μL da mistura acrescentou-se 1,0 mL do reagente DNS. A quantidade de açúcar redutor formado foi determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 11/ Bio), utilizando uma curva padrão constituída com N-acetilglicosamina (GlcNAc). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por hora. Quitina regenerada e água destilada (sem enzima) foram utilizadas como controle.

Preparação da quitina regenerada (quitosana acetilada):

A quitina regenerada foi preparada pela acetilação de quitosana conforme descrito por Molano *et al.* (1977). Um grama de quitosana dissolvido em 100 mL de ácido acético 10% (v/v) foi macerado em um gral de porcelana e incubado por 17 horas a temperatura ambiente. Após este período foram adicionados, lentamente, 30 mL de etanol e a solução obtida foi filtrada em gaze. Ao filtrado foi adicionado anidrido acético, sob agitação lenta, até que a solução ficasse gelatinosa. Essa solução foi deixada para solidificar por 30 minutos a temperatura ambiente. A mistura gelatinosa foi homogeneizada em um liquidificador com 1,0 volume de metanol e, posteriormente, centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos em centrífuga (Hitach - himac CR 21) refrigerada a 4°C. O sedimento foi lavado exaustivamente com água destilada até sua neutralização (pH 7,0), liofilizado e estocado a -20°C.

4.3 – Ensaio para amilase

4.3.1 – Atividade Dextrinizante (*Fuwa, 1954*)

A 100 μL de solução de amido 0,5% foram adicionados 40 μL de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 6,0, e 60 μL de enzima tamponada em pH 6,0. A mistura de reação foi incubada a 40 °C durante 30 minutos e interrompida com adição de 200 μL de ácido acético 1 M. O volume foi então completado com água para 9,8 mL e 200 μL de solução de iodo/iodeto (1 v de iodo 1,0% dissolvido em etanol absoluto; 1 v de iodeto de potássio 10,0% dissolvido em água destilada, e 3v de H₂O destilada) foram acrescentados (*Fuwa, 1954*). A absorvância foi determinada a 600 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 11/ Bio). A quantidade de amido hidrolisado foi calculada de acordo com uma curva padrão construída com quantidades crescentes de amido solúvel na faixa de 0 a 0,5 mg. Uma unidade de atividade aminolítica dextrinizante foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido, por minuto, nas condições descritas acima.

4.3.2 – Atividade sacarificante (*Bernfeld, 1955*)

Adicionou-se volumes de 20 μL de enzima a 40 μL de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 6,0. Posteriormente adicionou-se a esta solução 150 μL de amido solúvel a 0,5%. A mistura de reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos. A seguir foram adicionados 1,5 mL do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS). A mistura final foi aquecida por 5 minutos em banho-maria a 96°C, resfriada e acrescentados 7,75 mL de água destilada. A absorvância foi determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 11/ Bio) e a quantidade de açúcar redutor formado foi determinado utilizando-se uma curva padrão construída com quantidades crescentes de glicose na faixa de 0 a 2 mg. Uma unidade de atividade aminolítica sacarificante foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 0,1 mg de açúcar redutor por minuto.

4.4 – Ensaio para protease

A atividade de protease total foi determinada segundo o método descrito por *Kunitz* (1946), com pequenas modificações: em 100 µL de uma solução de caseína “Hammarsten” a 1%, dissolvida em tampão Hepes 0,5 M, pH 8,0 foram adicionados 500 µL de amostra enzimática. A mistura da reação foi incubada a 37°C durante 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,9 mL de TCA 5%. Após 40 minutos de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas em centrífuga de bancada (Hettich MIKRO 200R) a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e a absorbância do sobrenadante determinada à 280 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 11/ Bio). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para aumentar em uma unidade a absorbância do sobrenadante da reação a 280 nm, por 20 minutos de reação.

5 – Cinética e hidrólise de caseína

5.1 – Determinação do pH ótimo das enzimas

Para determinação do pH ótimo da proteinase, a mistura da reação e as condições de ensaio foram idênticas às descritas no item 4.4, porém substituindo o sistema tamponante. Foram utilizados os seguintes tampões na concentração de 50 mM: citrato de sódio para pH 2,0; acetato de sódio para pH de 3,0 a 5,0; fosfato de sódio para pH de 6,0 a 8,0 e para pH 9,0 e 9,5 foi utilizado tampão Tris-HCl.

5.2 – Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade das enzimas

Para determinação da temperatura ótima para proteinase foi utilizado o método de dosagem enzimática descrito no item 4.4, tendo a temperatura variado em banho-maria, de 2 a 90°C. Os ensaios para termoestabilidade foram realizados com a enzima pré-incubada por vários tempos (0, 20, 40, 60 e 80 minutos) a 37°, 50° e 60°C e a atividade residual determinada a 37°C.

6 – Purificação parcial da protease

6.1 – Concentração das amostras de protease

Amostras de sobrenadantes de culturas obtidas conforme item 3 foram concentradas por ultrafiltração usando uma membrana com poros para retenção de proteínas com pesos moleculares acima de 10 kDa.

6.2 – Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose

Amostras de sobrenadante de cultura concentrado foram aplicadas em uma coluna de DEAE-Sepharose previamente equilibrada à 4°C com tampão Hepes 50mM pH 8,0. A eluição das proteínas foi feita com um gradiente linear formado por 120 mL de tampão Hepes 50mM pH 8,0 e 120 mL do mesmo tampão contendo NaCl (0,5 M) e realizada com um fluxo contínuo de 60 mL por hora. Frações de 6,0 mL foram coletadas e a concentração de proteínas estimada medindo-se a absorvância das amostras a 280 nm. A atividade de protease nas frações foi determinada conforme item 4.4, e aquelas com atividade foram reunidas e concentradas por ultrafiltração.

6.3 – Cromatografia em coluna de SP-Sepharose

Amostras provenientes da cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose foram aplicadas em uma coluna de SP-Sepharose (catiônica) seguindo as mesmas condições de corrida cromatográfica da coluna anterior.

6.4 – Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose

Amostras provenientes da coluna SP-Sepharose foram aplicadas em uma coluna de DEAE-Sepharose (aniônica) seguindo as mesmas condições de corrida cromatográfica da coluna anterior para o isolado CEN 93 e alternativamente, para o isolado CEN 62 foi utilizado o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 também seguindo as mesmas condições de corrida cromatográfica da coluna anterior.

6.5 – Fracionamento do sobrenadante do meio de cultura com sulfato de amônio:

Amostras de sobrenadantes de culturas do isolado CEN 62 obtidas conforme item 2, foram submetidas a um fracionamento por 2 precipitações sucessivas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à temperatura de 4°C com agitação contínua. Após uma primeira precipitação com 30 g de

(NH₄)₂SO₄ em 100 mL de amostra, o material foi submetido à centrifugação de 15.000 rpm durante 20 minutos. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante novamente submetido à precipitação com 60 g de (NH₄)₂SO₄. As mesmas condições para a centrifugação foram repetidas. O sobrenadante nesta etapa foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 20 mL de água destilada.

7 – Caracterização eletroforética de proteases

7.1 – Eletroforese desnaturante

Os perfis eletroforéticos de amostras de proteínas foram analisados em gel de poliacrilamida (12%), em condições desnaturantes, segundo *Laemmli* (1970). A eletroforese foi conduzida em temperatura ambiente com uma voltagem constante de 100V utilizando-se um sistema (Mini Gel – Sigma) de eletroforese de placa (10 x 8 cm). As amostras submetidas à eletroforese foram precipitadas com TCA 70%, para uma concentração final de TCA de 10%, lavadas duas vezes com acetona (2:1 em água destilada) e ressuspensas em 30 µL de tampão de amostra desnaturante 1x (*Laemmli*, 1970), fervidas durante 5 minutos, e aplicadas no gel.

Os padrões de massa molecular utilizados foram: MBP-β galactosidase (175 kDa), MBP-paramiosina (83 kDa), desidrogenase glutâmica (62 kDa), aldolase (47,5 kDa), triose fosfato isomerase (32,5 kDa), β-Lactoglobulina A (25 kDa), Lisozima (16 kDa) e A protinina (6,5 kDa), M *P77085* adquirido da *BioLabs*.

7.1.1 – Revelação de proteínas no gel

7.1.1.1 – Coloração com Prata

Com o término da corrida eletroforética, o gel foi corado para proteína, segundo o método descrito por *Blum et al* (1987). Para tanto, o gel foi colocado em uma solução fixadora de 50% (v/v) de metanol e 12% (v/v) de ácido acético glacial por um período de no mínimo 2 horas, sob agitação. A solução foi então substituída por etanol 50% (v/v) por 1 hora, com trocas a cada 20 minutos. Na etapa seguinte, o gel foi incubado em uma solução de

0,02% (p/v) de tiosulfato de sódio por 1 minuto sob agitação e lavado 3 vezes por 1 minuto com água destilada antes de ser incubado em solução 0,2% (p/v) de nitrato de prata contendo 75 µL de formaldeído a 37% (v/v). Após um período de 20 minutos, o gel foi lavado 3 vezes com água destilada por 1 minuto e então imerso em 50 mL de solução reveladora [6% (p/v) de carbonato de sódio contendo 50 µL de formaldeído a 37% (v/v) e 1 mL da solução de tiosulfato de sódio] até a visualização das proteínas. A reação foi então paralisada com a incubação do gel em solução descorante [50% (v/v) de metanol e 12% (v/v) de ácido acético glacial].

Ó Preparo do tampão de amostra e gel:

Tampão de amostra 1X desnaturante:

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	200 µL
Água destilada	3,2 mL
Glicerol	320 µL
SDS 10%	320 µL
β-Mercaptoetanol	80 µL
Bromofenol blue	1,6 mL

Gel:

1ºGel – SDS Separador 12%

Água destilada	2,0 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,5 mL
SDS 10%	60 µL
Acilamida/Bis	2,4 mL
PA 10%	30 µL
TEMED	3 µL

2°Gel – SDS Concentrador

Água destilada	1,8 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	750 µL
SDS 10%	30 µL
Acrilamida/Bis	400 µL
PA 10%	15 µL
TEMED	3 µL

8 – Técnicas de dosagem

8.1 – Dosagem do açúcar redutor

Aos 250 µL de amostra foi adicionado 1,0 mL de reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) e a mistura incubada em um banho fervente durante 5 minutos (*Miller, 1959*). A absorbância das amostras foram determinadas à 550 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 11/ Bio).

O reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) foi preparado adicionando-se lentamente a solução A (10 g de DNS dissolvidos em 200 mL de NaOH 2 M aquecido) à solução B (300 g de tartarato de Na⁺ e K⁺ tetra hidratado dissolvidos em 500 mL de água destilada), e o volume final completado com água destilada para 1000 mL.

8.2 – Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas nas amostras enzimáticas foram determinadas pelo método colorimétrico descrito por *Bradford (1976)*.

RESULTADOS

1) Formação de halos pelos isolados CEN 62 e CEN 93 de *Dicyma pulvinata*

Os isolados CEN 62 e CEN 93 foram avaliados cinco dias após o repique, quanto as suas capacidades de crescimento mediante diferentes substratos. (Figs. 5-9).

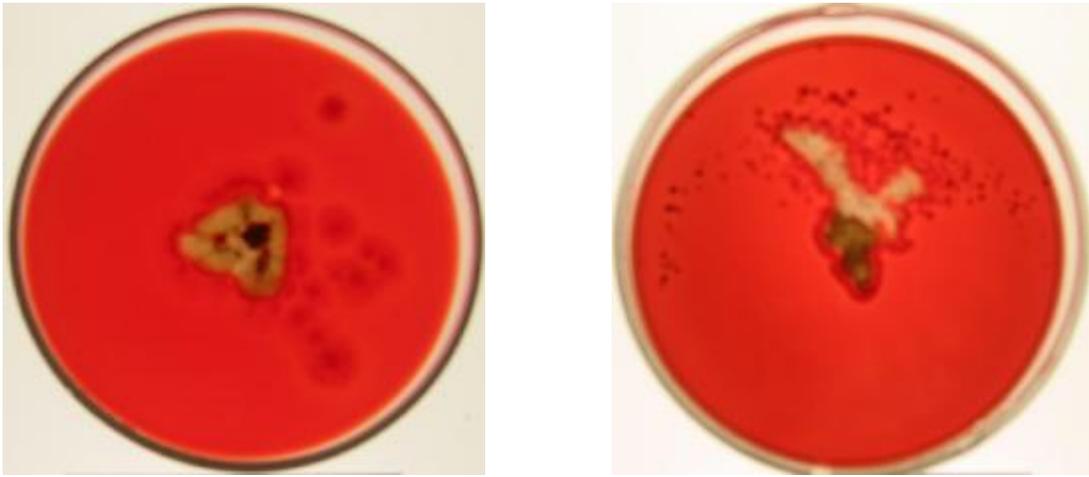


Figura 5: Formação de halo de hidrólise de celulose pelos isolados CEN 62 e CEN 93, respectivamente.



Figura 6: Formação de halo de hidrólise de amido pelos isolados CEN 62 e CEN 93, respectivamente.

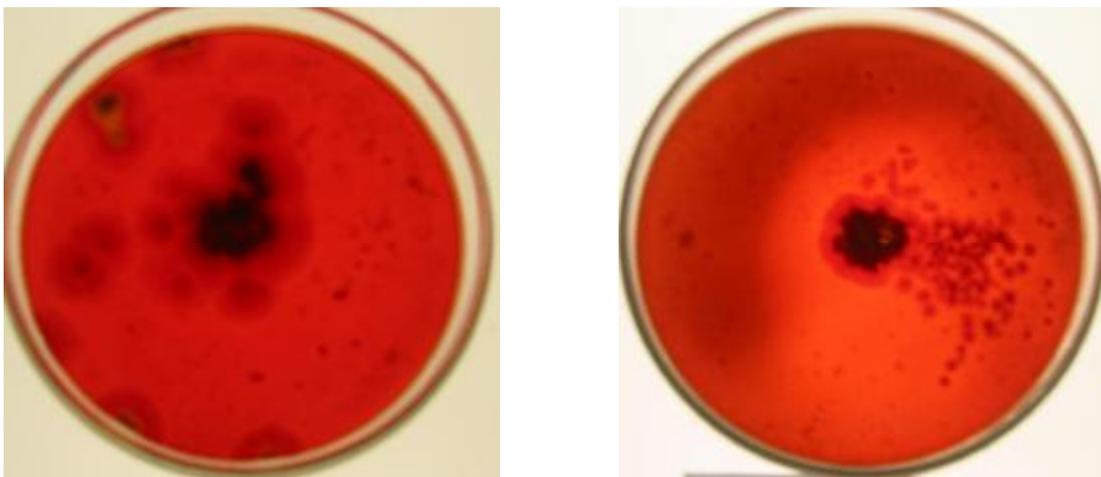


Figura 7: Formação de halo de hidrólise de β -Glucana pelos isolados CEN 62 e CEN 93, respectivamente.

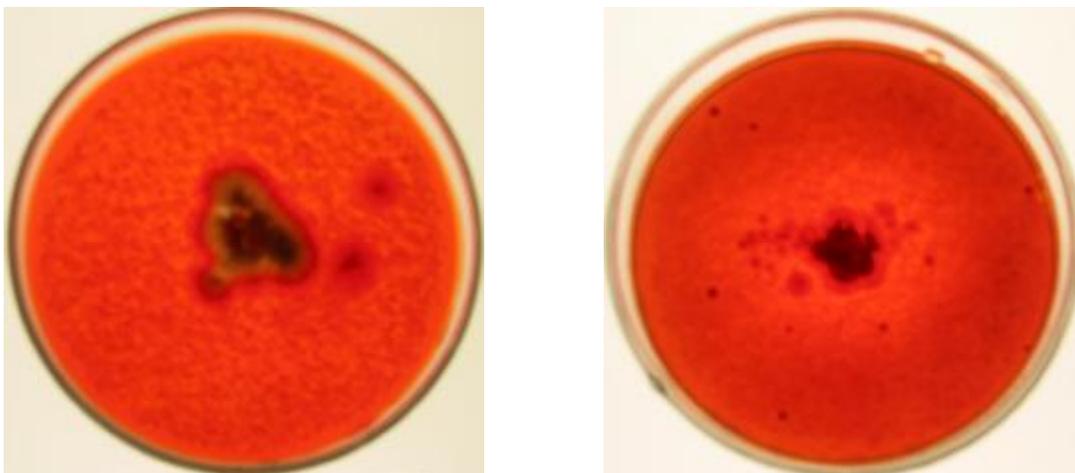


Figura 8: Formação de halo de hidrólise de quitina pelos isolados CEN 62 e CEN 93, respectivamente.

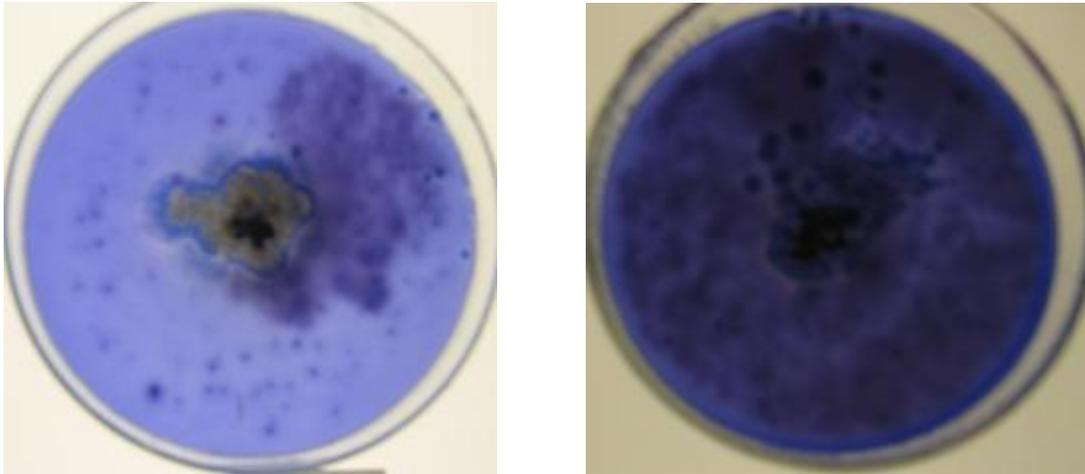


Figura 9: Formação de halo de hidrólise de caseína pelos isolados CEN 62 e CEN 93, respectivamente.

Os dois isolados apresentaram crescimento e formação de halo de hidrólise em celulose, amido, β -glucana, quitina e caseína, (Figuras: 5 – 9).

2 – Produção de enzimas hidrolíticas por isolados de *Dicyma pulvinata*

Os isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* foram avaliados quanto às suas capacidades de produção de enzimas hidrolíticas.

A maior atividade de β -1,3-glucanase foi encontrada no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN 62 de *D. pulvinata* incubado por 24 h (0,071 U/mL). Esta atividade é 71 vezes maior do que aquelas produzidas pelo isolado CEN 93 (Figura 10). Foram consideradas significativas as atividades cujos valores de absorbância da mistura de reação foram maiores do que 0,2 , ou seja, 0,053 U/mL.

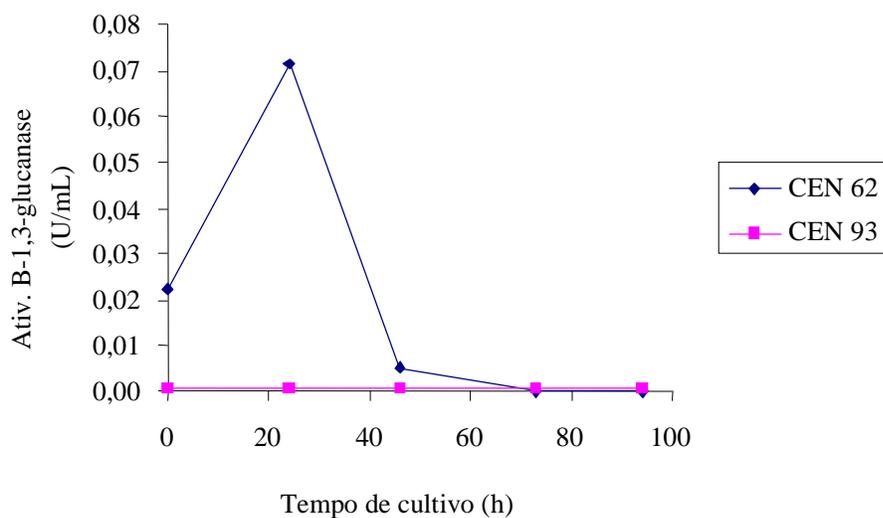


Figura 10: Atividade de β -1,3-glucanase (U/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* crescidos por 94 h em meio sintético na presença de 0,5% de β -glucana.

A maior atividade de quitinase foi encontrada no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN 62 (0,11 U/mL) após 254 h de cultivo. Entretanto, atividades equivalentes (0,10 U/mL) foram encontradas nos sobrenadantes dos dois isolados após 240 h de crescimento (Figura 11). Foram consideradas significativas as atividades cujos valores de absorbância da mistura de reação foram maiores do que 0,2 , ou seja, 0,25 U/mL.

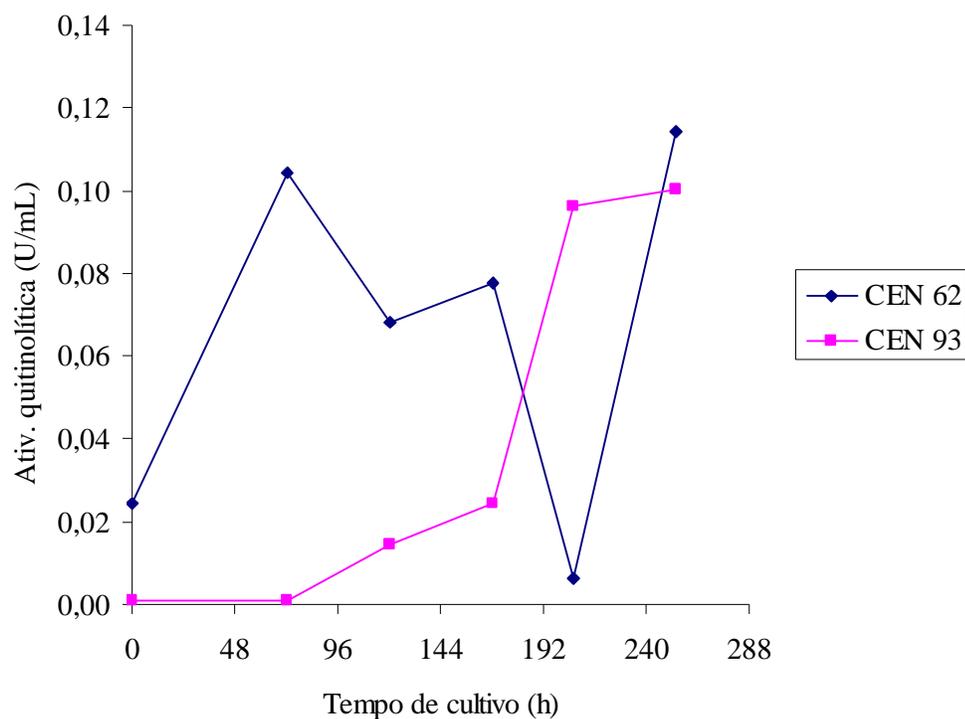


Figura 11: Atividades de quitinase (U/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* crescidos por 254 h em meio sintético na presença de 0,5% de quitina.

A maior atividade de amilase dextrinizante foi encontrada no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN 62 de *D. pulvinata* incubado por 72 h (0,25 U/mL). Esta atividade é 2 vezes maior do que aquelas produzidas pelo isolado CEN 93 (Figura 12). Foram consideradas significativas as atividades cujos valores de absorbância da mistura de reação foram maiores do que 0,2 , ou seja, 0,16 U/mL

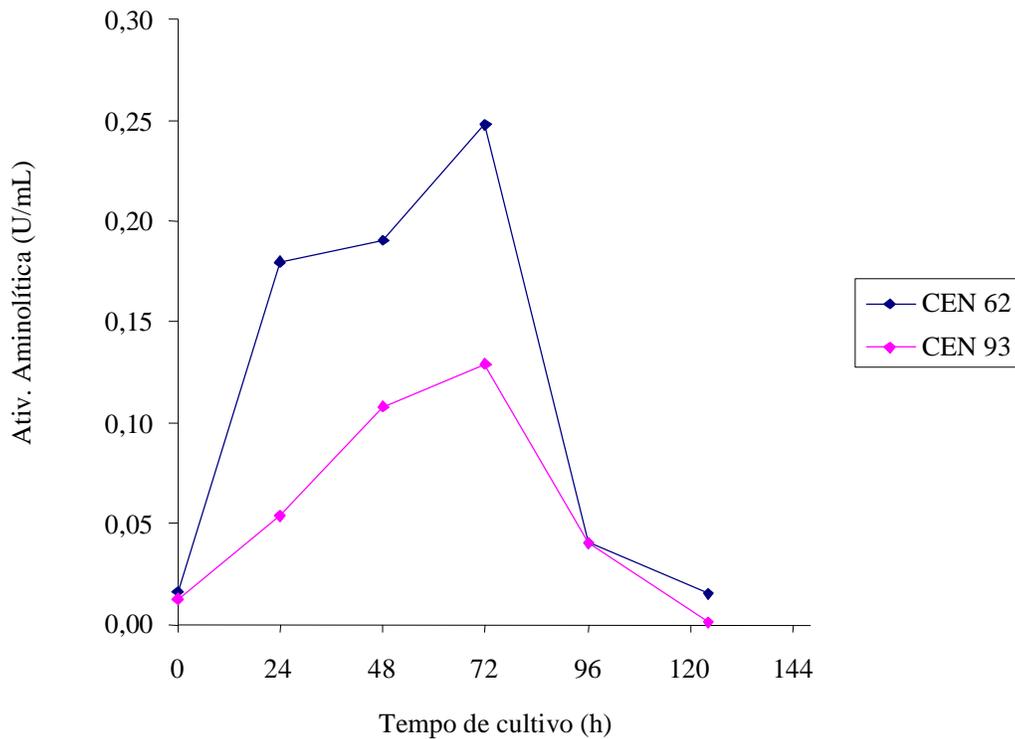


Figura 12: Atividade de amilase dextrinizante presente nos sobrenadantes dos meios de culturas dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* durante 124 h de crescimento em meio sintético na presença de 0,5% de amido.

A maior atividade de amilase dextrinizante foi encontrada no micélio da cultura do isolado CEN 93 de *D. pulvinata* incubado por 124 h (0,248 U/mL). Entretanto, atividade equivalente (0,188 U/mL) foi encontrada para o isolado CEN 62 (Figura 13). Foram consideradas significativas as atividades cujos valores de absorbância da mistura de reação foram maiores do que 0,2 , ou seja, 0,167 U/mL.

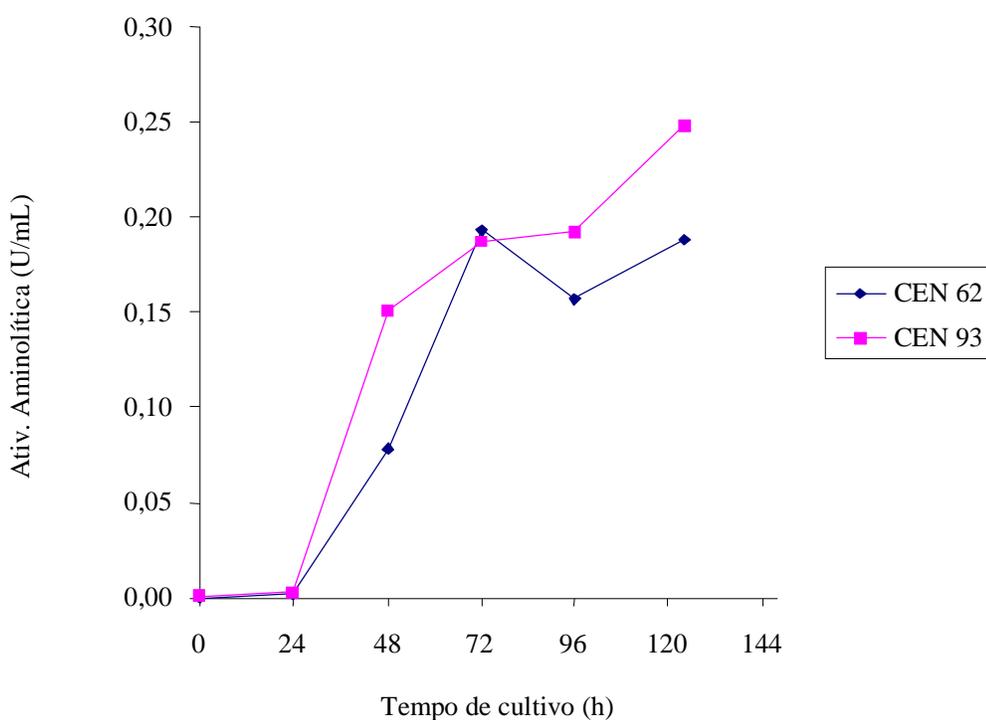


Figura 13: Atividade de amilase dextrinizante associada ao micélio dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* durante 124 h de crescimento em meio sintético na presença de 0,5% de amido.

A maior atividade sacarificante foi encontrada no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN 62 com 72h (0,26 U/mL). Tal atividade é 5,2 vezes maior do que a maior atividade do isolado CEN 93 com 48 h (0,05 U/mL) (Figura 14). Foram consideradas significativas as atividades cujos valores de absorvância da mistura de reação foram maiores do que 0,2 , ou seja, 0,05 U/mL.

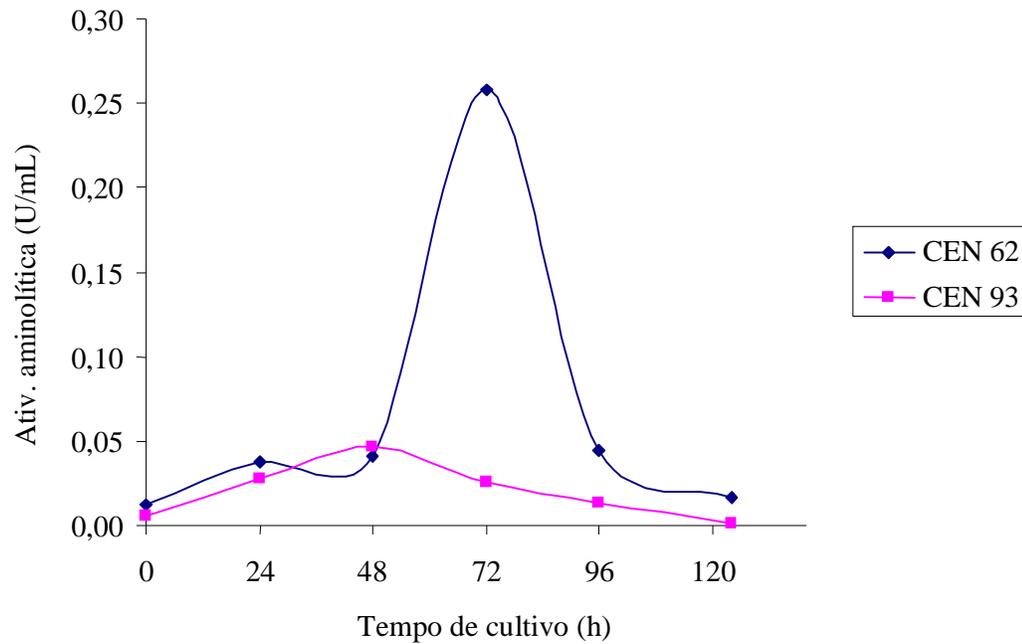


Figura 14: Atividade de amilase sacarificante presente nos sobrenadantes dos meios de cultura dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* durante vários tempos de crescimento em meio sintético na presença de 0,5% de amido.

A maior atividade sacarificante associada ao micélio de *D. pulvinata* foi do isolado CEN 62 com 96 h (0,15 U/mL) de crescimento em meio contendo amido. Tal atividade é 2 vezes maior do que a maior atividade do isolado CEN 93 com 72 h (0,07 U/mL) (Figura 15). Foram consideradas significativas as atividades cujos valores de absorbância da mistura de reação foram maiores do que 0,2 , ou seja, 0,05 U/mL.

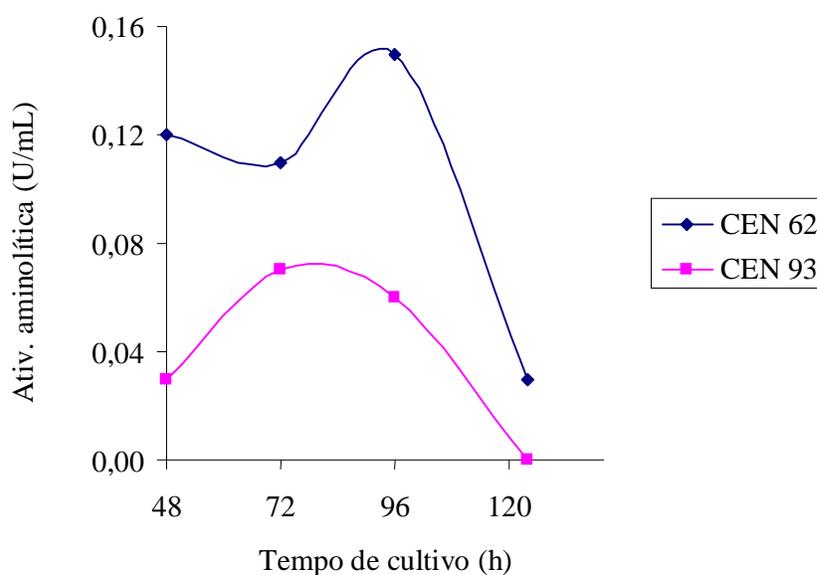


Figura 15: Atividade de amilase sacarificante associado ao micélio dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* durante 124 h de crescimento em meio sintético na presença de 0,5% de amido.

Os resultados apresentados na figura 16 indicam o aumento do pH em meio contendo caseína 0,5% durante o crescimento dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata*. Para o isolado CEN 62 entre pH 8,7 a 9,0 houve um significativo aumento de pH, enquanto, para o isolado CEN 93 o pH 7,6 foi o máximo atingido.

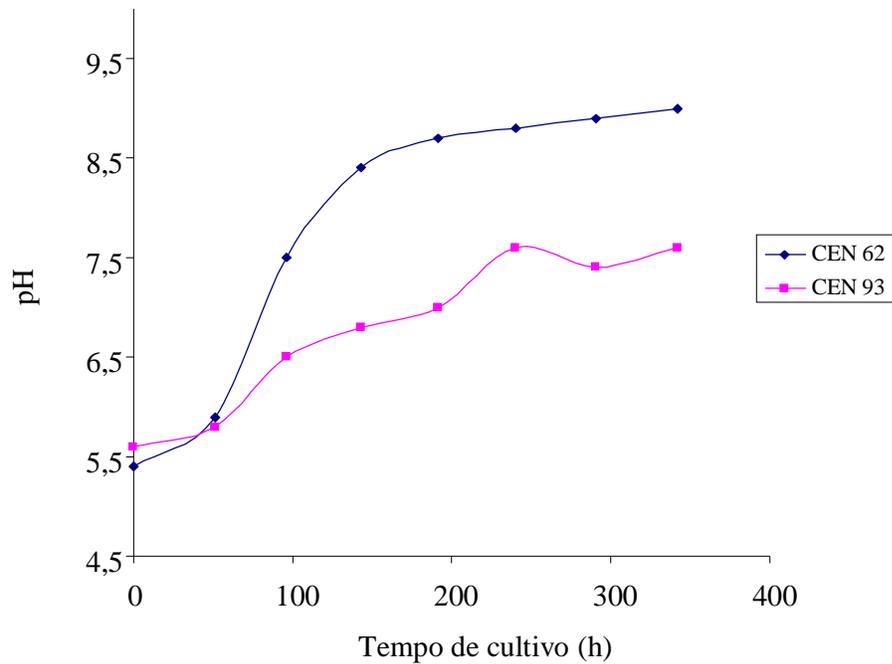


Figura 16: Variação de pH no meio de cultura dos isolados CEN 62 e CEN93 de *D. pulvinata* crescidos durante vários tempos em meio sintético contendo 0,5% de caseína.

Quanto à atividade de proteases, os dois isolados [CEN 62 e CEN 93] produziram quantidades significativas destas enzimas. Porém a atividade produzida pelo isolado CEN 62 com 240 h (0,088 U/mL) foi significativamente maior do que a do isolado CEN 93 com atividade máxima em 192 h (0,039 U/mL) (Figura 17). Para protease foram consideradas significativas as atividades cujos valores de absorbância da mistura de reação foram superiores a 0,2 , ou seja, 0,02 U/mL.

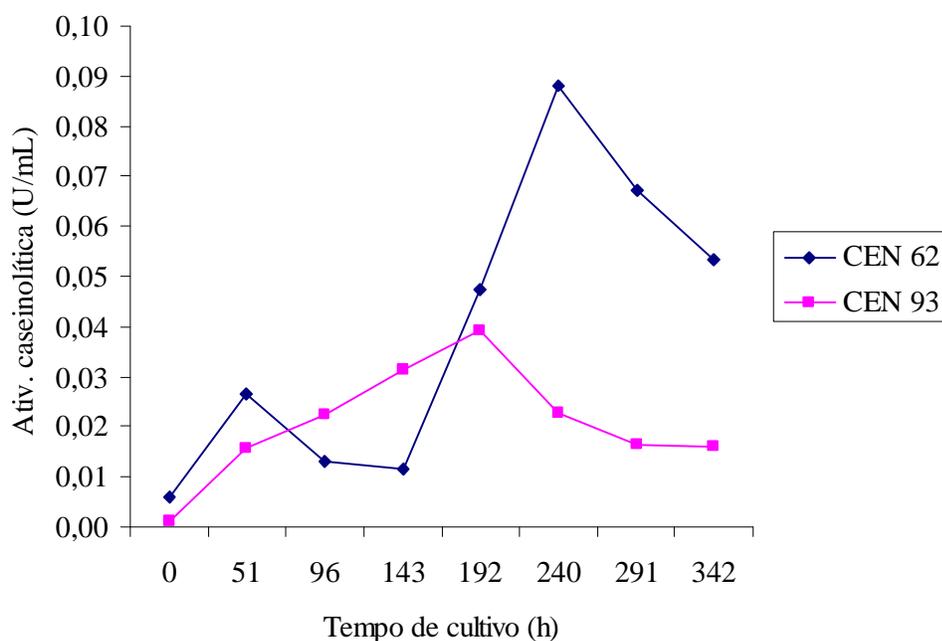


Figura 17: Atividade caseinolítica presente nos sobrenadantes dos meios de cultura, dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* crescidos durante vários tempos em meio sintético contendo 0,5% de caseína.

A atividade caseinolítica presentes nos sobrenadantes dos isolados CEN 62 e CEN 93 foram determinadas variando a temperatura e o tempo de reação. O isolado CEN 62 apresentou melhor atividade com 20 - 80 minutos de reação nas temperaturas de 37°C e 50°C (0,502 U/mL) (Figura 18), enquanto, o isolado CEN 93 apresentou maior atividade (0,525 U/mL) na temperatura de 50°C (Figura 19). A hidrólise de caseína foi definida como sendo a diferença de absorbância da mistura de reação no tempo final de reação menos aquela no tempo inicial de reação (Figuras: 18 e 19).

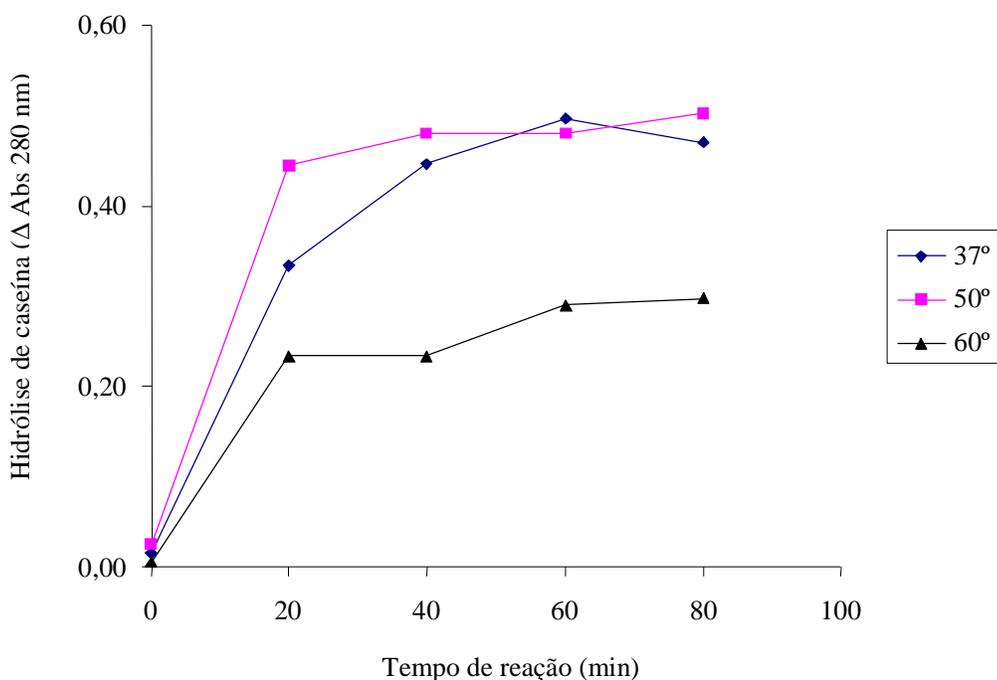


Figura 18: Atividade caseinolítica presente no sobrenadante do meio de cultura concentrado, do isolado CEN 62 de *D. pulvinata* crescido por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína. A atividade caseinolítica foi ensaiada nas temperaturas de 37, 50 e 60°C.

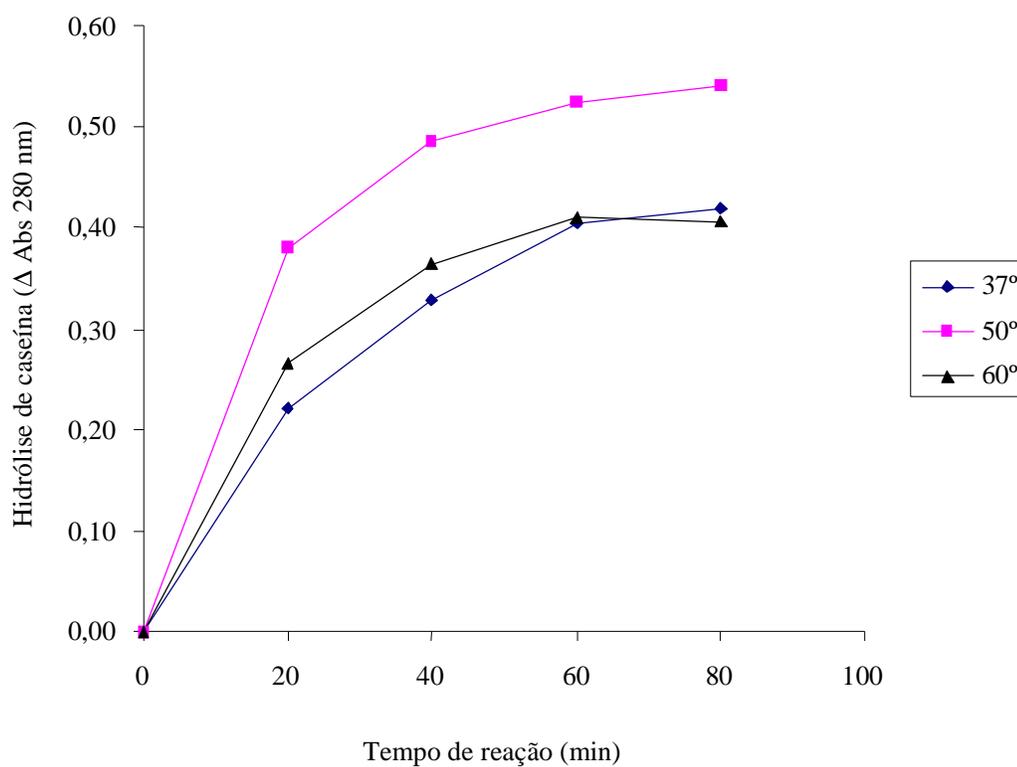


Figura 19: Atividade caseinolítica presente no sobrenadante do meio de cultura concentrado, do isolado CEN 93 de *D. pulvinata* crescido por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína. A atividade caseinolítica foi ensaiada nas temperaturas de 37, 50 e 60°C.

Para o isolado CEN 62, a maior atividade caseinolítica foi determinada em pH 8,5 (0,327 U/mL). Entretanto, para o isolado CEN 93 a maior atividade foi determinada em valores de pH 8,0 (0,120 U/mL) (Figura 20).

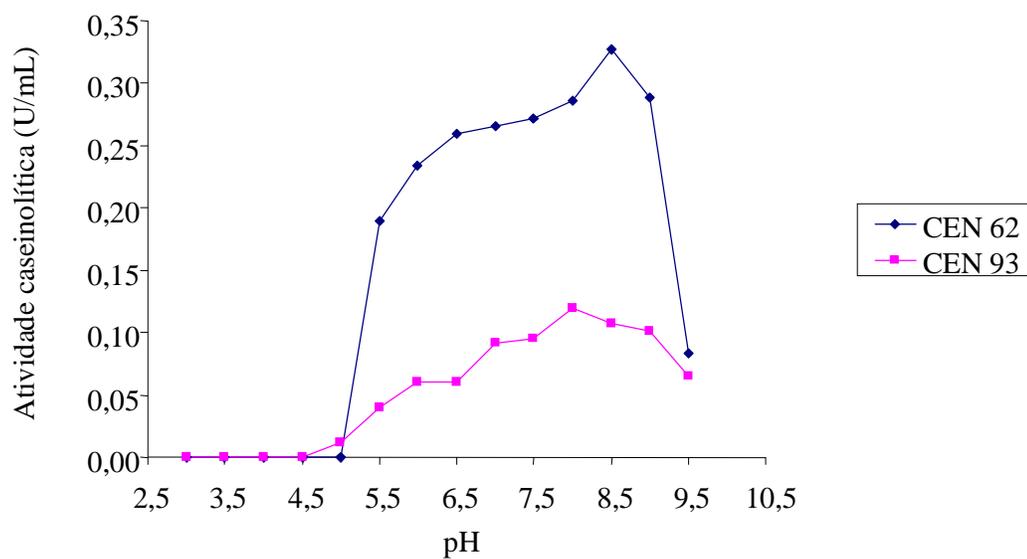


Figura 20: Efeito do pH na atividade caseinolítica presente nos sobrenadantes dos meios de cultura concentrados, dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* crescidos por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína.

Para o isolado CEN 62 a maior atividade caseinolítica foi encontrada em 45°C (0,82 U/mL). Entretanto, a atividade do isolado CEN 93 mostrou-se ligeiramente inferior (0,74 U/mL) nesta temperatura(Figura 21).

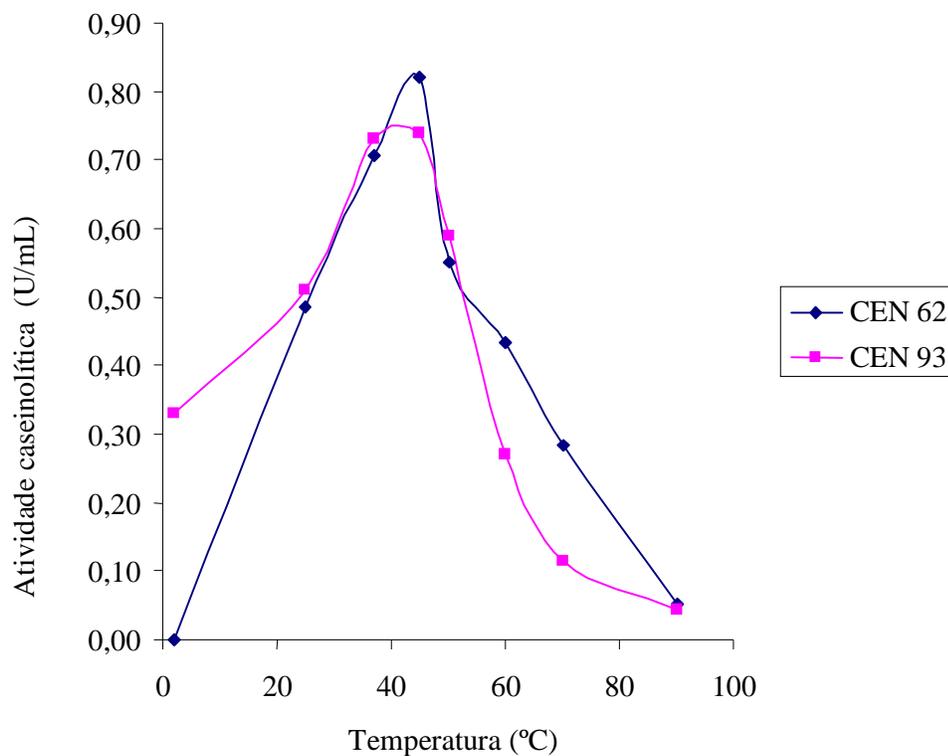


Figura 21: Efeito da temperatura na atividade caseinolítica presente nos sobrenadantes dos meios de cultura concentrados, dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* crescidos por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína.

Para observar o efeito da temperatura na estabilidade da enzima, a mesma foi pré-incubada a 37°C, 50°C e 60°C e alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo: 0, 20 min., 40 min., 60 min e 80 min. Para o isolado CEN 62 a maior atividade caseinolítica foi encontrada a 37°C no tempo zero de incubação (0,255 U/mL) com variações mínimas após 20 a 80 minutos de pré-incubação nesta mesma temperatura, porém decrescendo bruscamente com o aumento da temperatura e do tempo de pré-incubação (Figura 22). Entretanto, a atividade do isolado CEN 93 mostrou-se significativamente inferior (0,093 U/mL) nas mesmas condições (Figura 23).

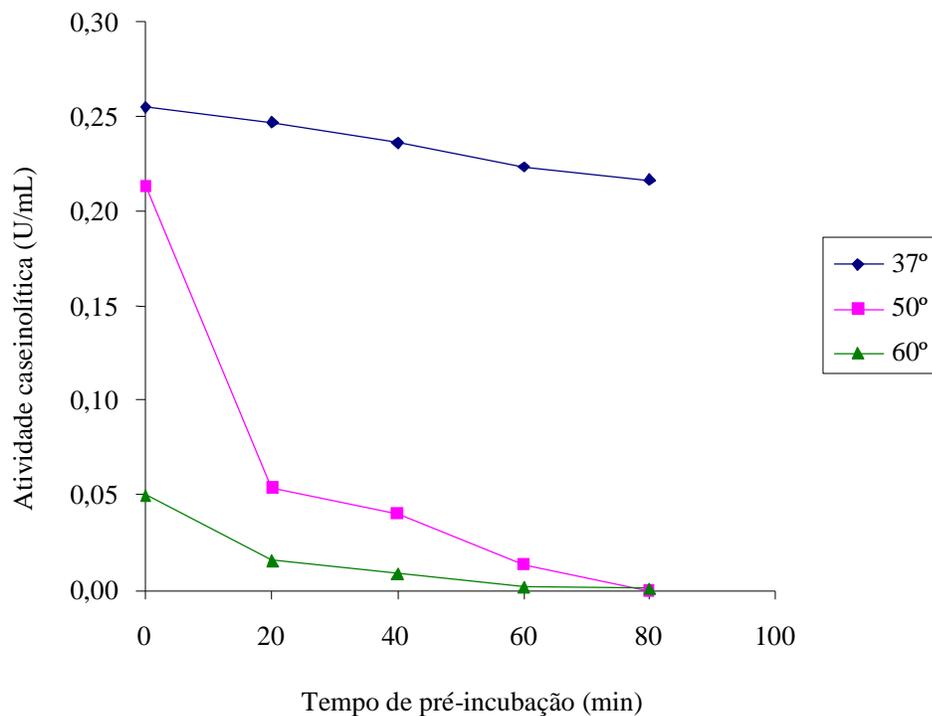


Figura 22: Efeito da temperatura na estabilidade da caseinase presente no sobrenadante do meio de cultura concentrado, do isolado CEN 62 de *D. pulvinata* crescido por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína. As amostras foram pré-incubadas em diferentes temperaturas e tempos, e então ensaiadas a 37°C conforme Materiais e Métodos.

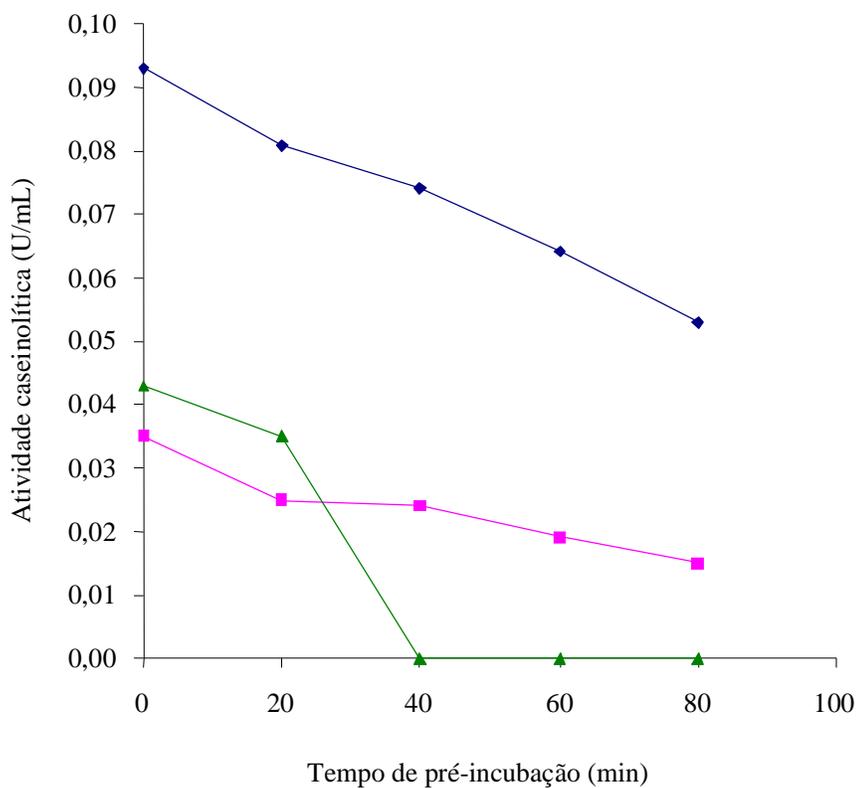


Figura 23: Efeito da temperatura na estabilidade da caseinase presente no sobrenadante do meio de cultura concentrado, do isolado CEN 93 de *D. pulvinata* crescido por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína. As amostras foram pré-incubadas em diferentes temperaturas e tempos, e então ensaiadas a 37°C conforme Materiais e Métodos.

3 – Cromatografias de amostras de protease presentes nos sobrenadantes concentrados dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata*

As amostras dos sobrenadantes dos meios de cultura dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* foram coletadas com 240 h de crescimento na presença de caseína, concentrados por ultrafiltração (extrato bruto), e então cromatografadas em uma coluna de troca iônica (aniônica) – DEAE-Sepharose. As cromatografias foram realizadas com um fluxo de 1 mL/min (6 mL/tubo) nas seguintes condições: tubos 1 ao 20, tampão Hepes 50 mM pH 8,0; tubos 21 ao 65, gradiente (0 a 0,5 M de NaCl); tubos 66 ao 80, tampão Hepes 50 mM pH 8,0 contendo 1 M de NaCl e tubos 80 ao 95, tampão Hepes 50 mM pH 8,0. O isolado CEN 62 resultou em quatro frações protéicas, das quais, duas apresentaram atividade para protease: frações (9 a 13 – Pico 1, e 44 a 59 – Pico 2) (Figura 24). O isolado CEN 93 resultou em três frações proteicas, das quais, duas apresentaram atividade para protease: frações (31 a 42 – Pico 1, e 57 a 66 – Pico 2) (Figura 25).

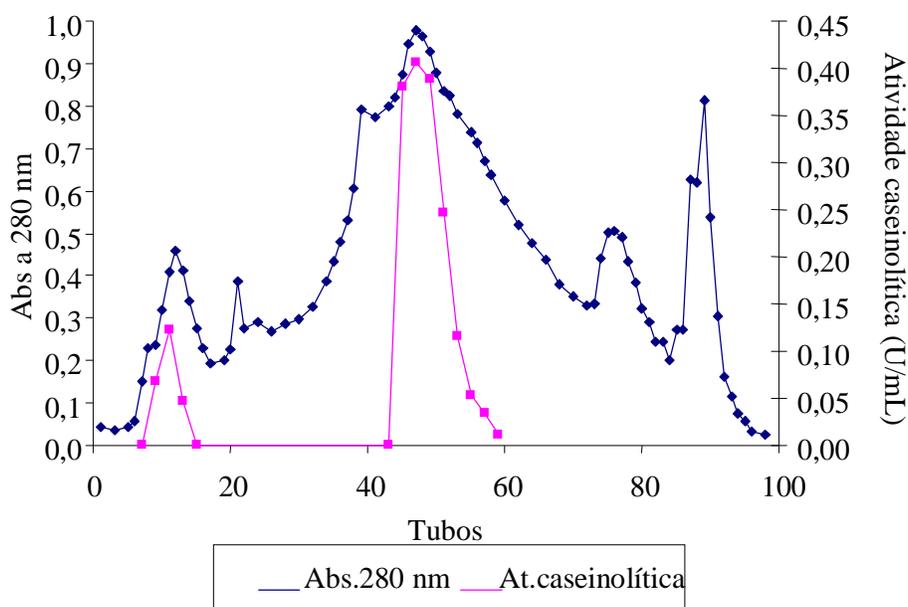


Figura 24: Perfil cromatográfico em coluna DEAE-Sepharose do sobrenadante do meio de cultura concentrado, do isolado CEN 62 de *D. pulvinata* crescido por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína.

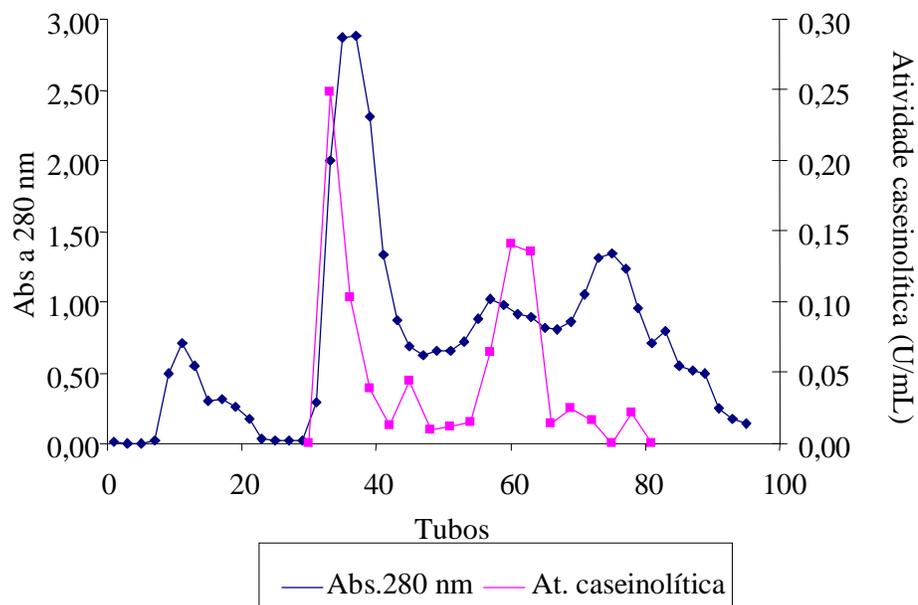


Figura 25: Perfil cromatográfico em coluna DEAE-Sepharose do sobrenadante do meio de cultura concentrado, do isolado CEN 93 de *D. pulvinata* crescido por 240 h em meio sintético contendo 0,5% de caseína.

As amostras com atividade caseinolítica das cromatografias anteriores, dos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata* foram reunidas, concentradas por ultrafiltração e aplicadas em uma coluna de troca iônica (catiônica) – SP-Sepharose. Para o isolado CEN 62, a segunda cromatografia resultou uma fração protéica com atividade para protease (frações 3 a 15) (Figura 26). Para o isolado CEN 93, a segunda cromatografia resultou em amostras protéicas com atividades significativas para protease (frações 5 a 14 - Pico 1 e 38 a 46 – Pico 3) (Figura 27). As cromatografias foram realizadas nas mesmas condições da coluna de DEAE-Sepharose.

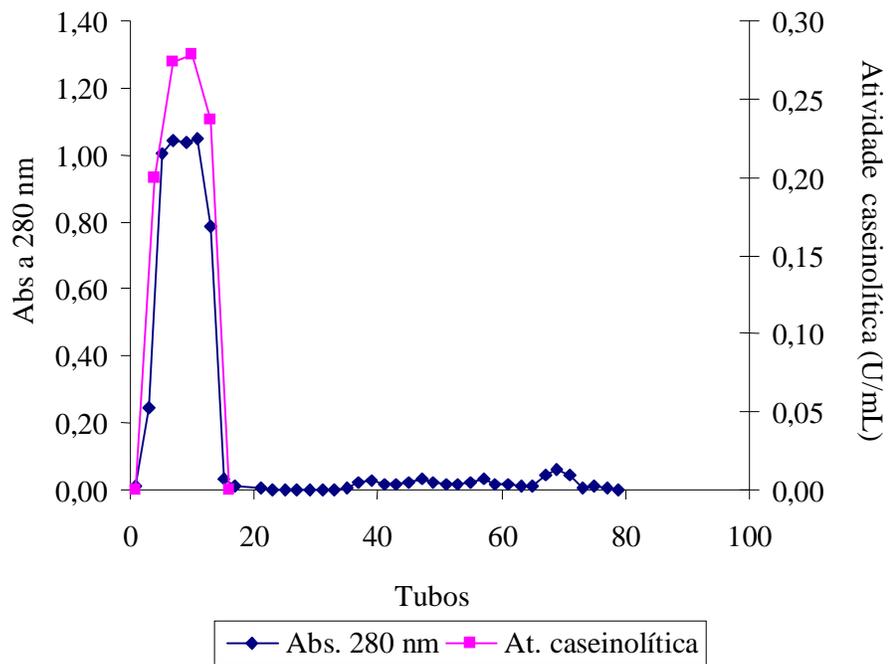


Figura 26: Perfil cromatográfico em coluna SP-Sepharose, de uma amostra de proteinase do isolado CEN 62 de *D. pulvinata* cromatografada previamente em coluna DEAE-Sepharose (Picos 1 e 2) (Figura 24).

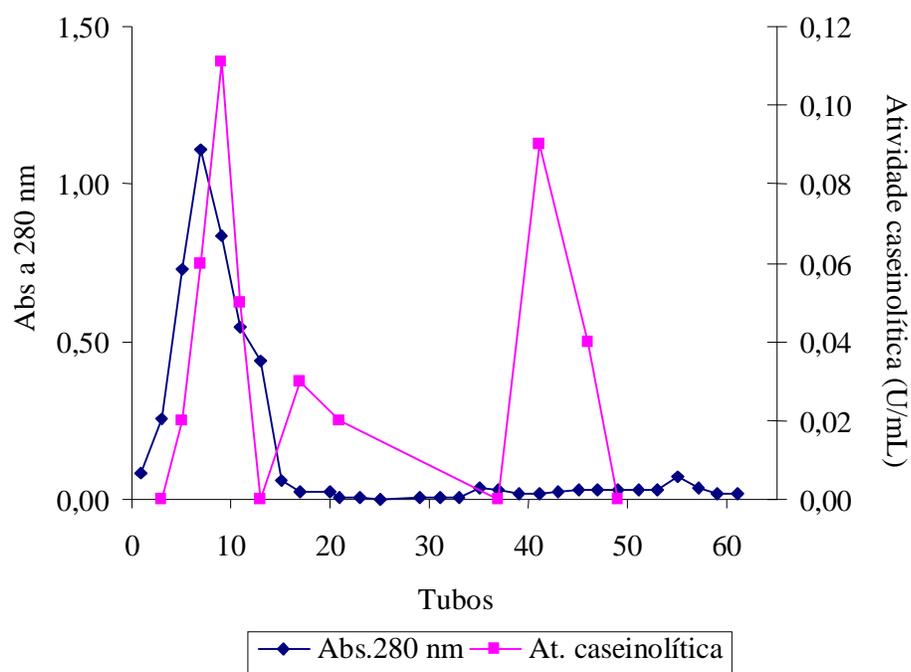


Figura 27: Perfil cromatográfico em coluna SP-Sepharose, de uma amostra de proteinase do isolado CEN 93 de *D. pulvinata*, cromatografada previamente em coluna DEAE-Sepharose (Picos 1 e 2) (Figura 25).

As amostras com atividade caseinolítica da cromatografia anterior do isolado CEN 93 de *D. pulvinata* foram reunidas, concentradas por ultrafiltração e aplicadas em uma coluna de troca iônica (aniônica) – DEAE – Sepharose, seguindo as mesmas condições de corrida cromatográfica da coluna anterior, enquanto para o isolado CEN 62 o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 foi usado em substituição ao tampão Hapes.

Para o isolado CEN 93 a cromatografia em DEAE-Sepharose resultou em duas frações proteicas, apresentando atividade para protease: (frações 41 a 59) (Figura 28), e enquanto que para o isolado CEN 62, resultou em três picos de proteínas, do qual, um apresentou atividade para protease: (frações 59 a 73) (Figura 29).

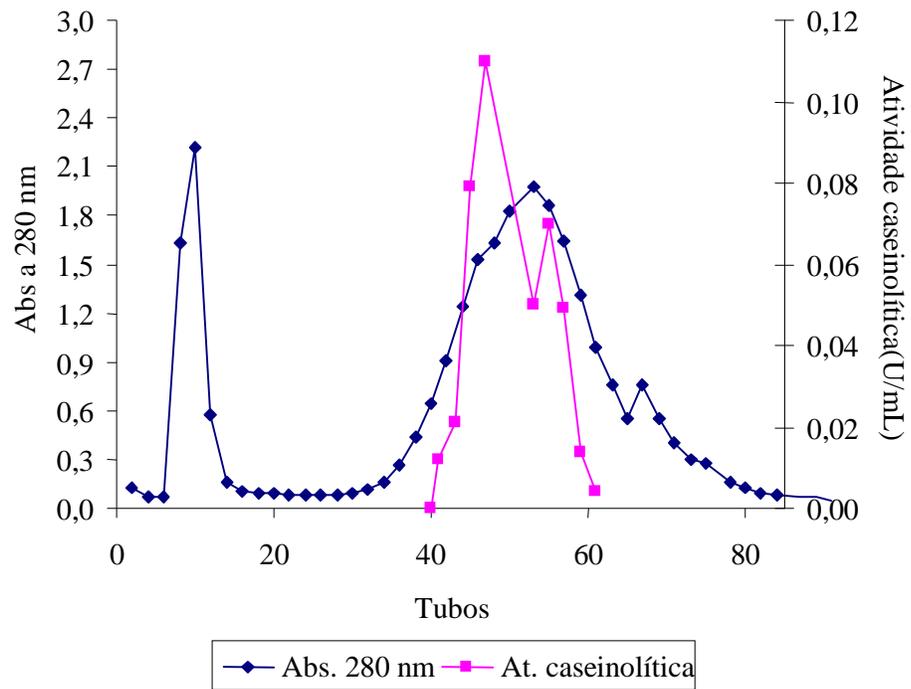


Figura 28: Perfil cromatográfico em coluna DEAE-Sepharose, de uma amostra de proteinase do isolado CEN 93 de *D. pulvinata* cromatografada previamente em coluna SP-Sepharose.

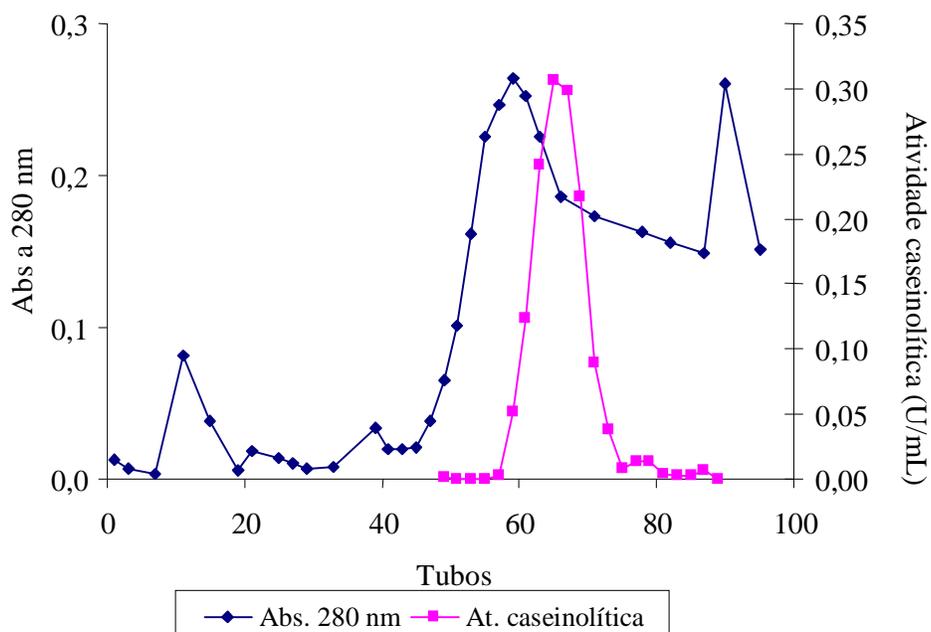


Figura 29: Perfil cromatográfico em coluna DEAE-Sepharose, de uma amostra de proteinase do isolado CEN 62 de *D. pulvinata*, cromatografada previamente em coluna SP-Sepharose.

Para o isolado CEN 62 foi realizada uma precipitação de proteínas com sulfato de amônio conforme descrito em Materiais e Métodos. O precipitado foi submetido à cromatografia de troca iônica (aniônica) – DEAE-Sepharose, na qual não apresentou atividade enzimática.

Análises em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes das proteínas presentes no extrato bruto e nas frações com atividade proteolítica revelaram a presença de diversas espécies proteicas nas amostras correspondentes aos dois isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata*.

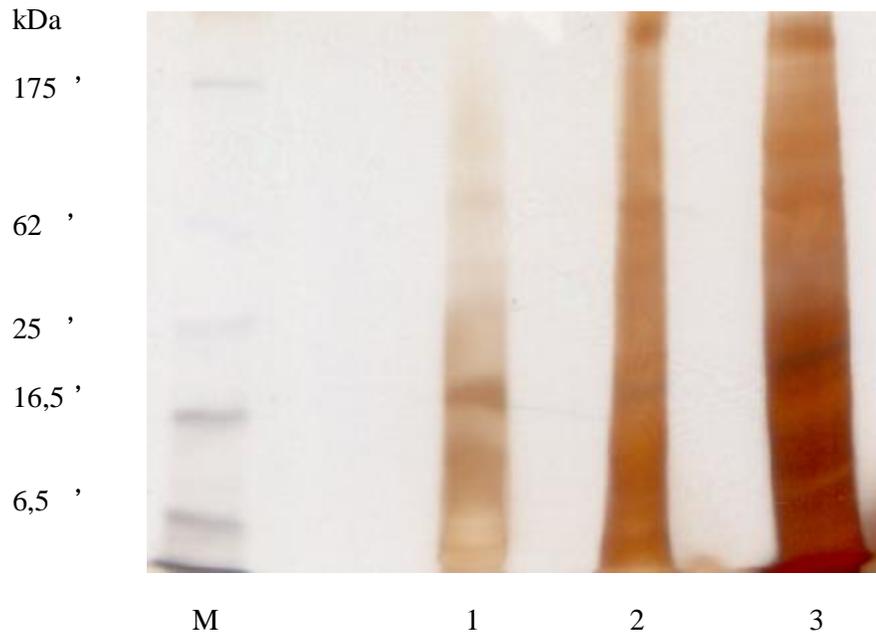


Figura 30: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) de amostras de protease produzida pelo isolado CEN 93 de *D. pulvinata*. Amostras: marcador (**M**) (item 7.1, página 20); extrato bruto (**1**); Eluato da coluna de DEAE-Sepharose (frações dos picos (1 e 2)) (Figura 25) (**2**); Eluato da coluna de SP-Sepharose (frações dos picos (1 e 3)) (Figura 27) (**3**).

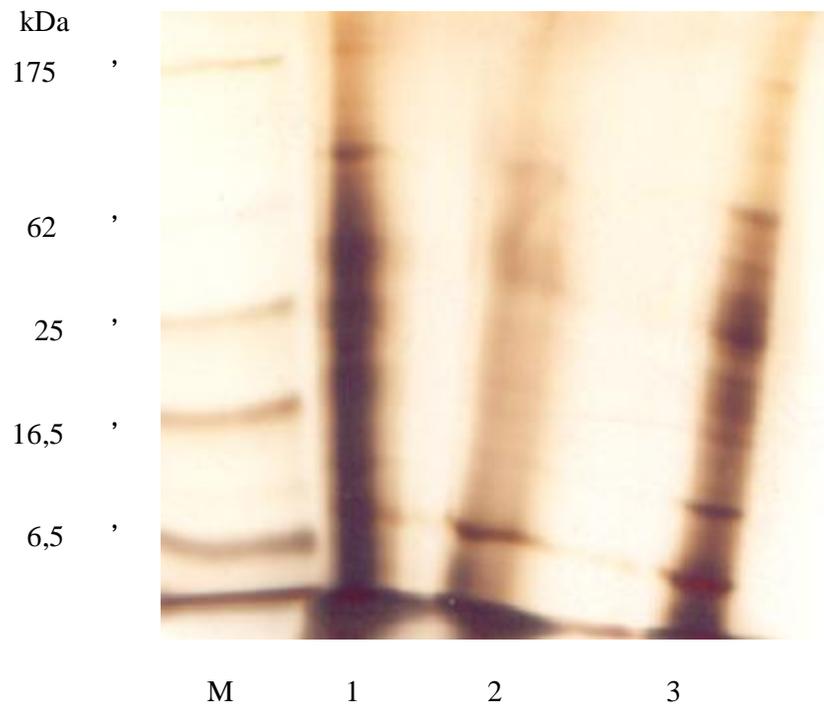


Figura 31: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) de amostras de protease produzida pelo isolado CEN 62 de *D. pulvinata*. Amostras: marcador (**M**) (item 7.1, página 20); extrato bruto (**1**); Eluato da coluna de DEAE-Sepharose (frações dos picos (1 e 2)) (Figura: 24) (**2**); Eluato da coluna de SP-Sepharose (fração do pico (1)) (Figura: 26) (**3**).

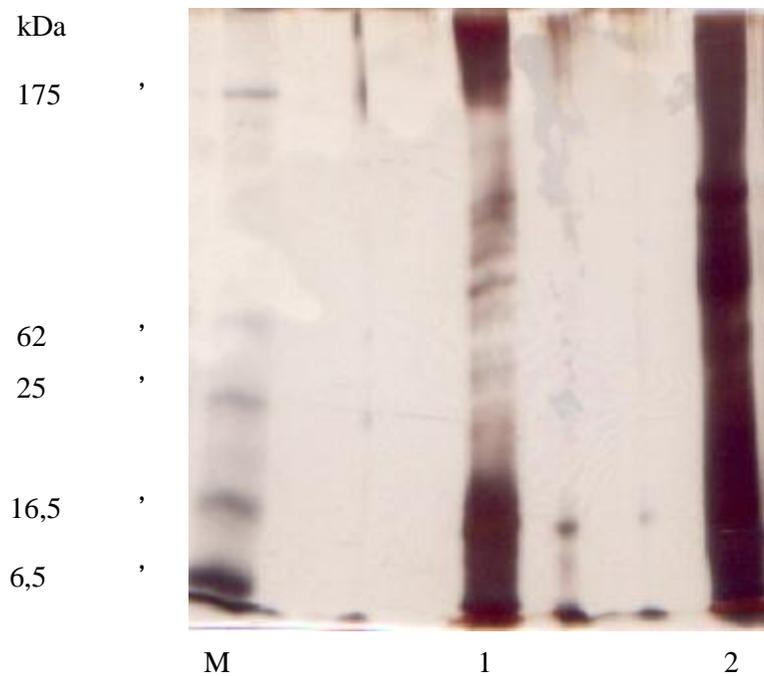


Figura 32: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) de amostras de caseinase produzidas pelos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata*. Amostras: marcador (M) (item 7.1, página 20); Eluato da segunda coluna de DEAE-Sepharose (frações 59 a 73) do isolado CEN 62 (Figura: 29) (1); Eluato da segunda coluna de DEAE-Sepharose (frações 43 a 59) do isolado CEN 93 (Figura 28) (2).

DISCUSSÃO

O mal-das-folhas, também denominado queima – das – folhas, é a doença mais grave da seringueira, e o principal problema para o estabelecimento de seringais de cultivo na América Central e do Sul. A doença causada pelo fungo *M. ulei* está distribuída em todas as áreas do Brasil, onde se encontra a seringueira (Gasparotto *et al.*, 1997). Esta doença tem sido combatida pela aplicação de químicos (Santos & Pereira, 1985; Brignani Neto *et al.*, 1991; Azevedo, 1991) e controle biológico (Bettiol, 2003).

Diversos experimentos conduzidos em casa de vegetação destacaram a importância de *D. pulvinata* como agente de biocontrole para o *M. ulei*, por destruir as estruturas e conseqüentemente, impedir reinfestações pelo patógeno (Santos *et al.*, 2001). Assim, *D. pulvinata* já vem sendo estudado pela equipe de controle biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, na busca de método de controle eficiente do mal-das-folhas (Mello *et al.*, 2003).

Acredita-se que enzimas desempenhem papéis primordiais no processo de antagonismo. Estas, por sua vez, são macromoléculas catalisadoras de reações químicas, presentes em todos os seres vivos, dos quais podem ser extraídas e aplicadas, livres ou imobilizadas, em sistemas diferentes daqueles que as originou (Pietro & Said, 2004).

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.*, 2000b), informações sobre o desempenho fundamental das enzimas micolíticas na hidrólise da parede de fungos fitopatogênicos.

Sendo assim, pode existir uma correlação entre o potencial antagônico e a secreção enzimática pelo antagonista, refletindo na eficiência de biocontrole. Portanto, a avaliação da produção de enzimas micolíticas por linhagens de *Dicyma pulvinata* é de caráter importante no entendimento do mecanismo molecular, responsável pela ação antagônica deste micoparasita sobre o fitopatógeno *M. ulei* (Mello *et al.*, 2002).

A análise da formação de halos de hidrólise foi o passo inicial para observar a capacidade de produção enzimática pelos dois isolados (CEN 62 E CEN 93) de *D. pulvinata*. Esta análise mostrou a capacidade de hidrólise pelos dois isolados, para β -glucana, amido, quitina, celulose e caseína (Figuras 5-9). O isolado CEN 62 apresentou melhor capacidade de hidrólise exceto para celulose. Apesar da eficiência das hidrolases microbianas na degradação de paredes celulares de células vegetais e de microrganismos, pouca importância tem sido dada à participação de celulasas nos processos de antagonismo (Migheli *et al.*, 1994).

A parede celular é constituída primariamente por quitina e proteínas, e outros compostos presentes em menores proporções. Durante o processo de micoparasitismo ocorre a destruição das estruturas celulares do microrganismo hospedeiro. A primeira barreira encontrada ao longo desse processo é a parede celular (Chet, 1990). O envolvimento de enzimas hidrolíticas com capacidade de degradar a parede celular de fungos fitopatogênicos deve ser, portanto, uma das mais importantes características dos microrganismos antagônicos (Elad *et al.*, 1982; Elad *et al.*, 1984; Chet & Inbar, 1994; Lima *et al.*, 1997). Desta forma, foi proposto analisar as atividades dos dois isolados para produção de: β -glucanase, amilase, quitinase e protease.

Na análise da atividade de β -1,3-glucanase foi observado que o isolado CEN 62 apresentou uma maior atividade para β -glucana no sobrenadante do meio de cultura comparado ao isolado CEN 93 que se apresentou inexpressivo sob as mesmas condições de crescimento (Figura 10). Muitas β -1,3-glucanases apresentam, ainda, funções relacionadas com a morfogênese de fungos (crescimento e desenvolvimento) ou com o processo de micoparasitismo. As β -1,3-glucanases (Lorito *et al.*, 1994) são capazes de inibir a germinação de esporos e inibir o crescimento celular de fitopatógenos.

A análise da quitinase revelou a capacidade de crescimento dos dois isolados de *D. pulvinata* em meio sintético contendo quitina 0,5%. O isolado CEN 62 apresentou inicialmente uma produção maior em 72 h de cultivo, porém decresceu em 120 h e retornou em 254 h. Para o isolado CEN 93 o aumento só começou a ser observado após 206 h (Figura 11). Inúmeros fungos produzem quitinases (Sahai & Manocha, 1993; Lima *et al.*, 1995, 1996, 1997; De Marco *et al.*, 1997, 1998) que em geral, constituem sistemas quitinolíticos, cuja complexidade é um desafio bioquímico. As propriedades das quitinases, seu envolvimento nos processos antagônicos e sua importância no controle biológico têm despertado grande interesse.

Foi analisado também a atividade aminolítica dextrinizante e sacarificante no sobrenadante e no micélio do meio de cultura dos dois isolados CEN 62 e CEN 93. O isolado CEN 62 apresentou maior atividade para ambas as atividades no sobrenadante e para atividade sacarificante no micélio (Figs. 12, 14 e 15), porém, o isolado CEN 93 apresentou maior atividade para atividade dextrinizante associada ao micélio (Figura 13). De acordo com a literatura, não foi descrita ainda a presença de amido na constituição da parede celular de fungos (Bartinicki-Garcia, 1968). Portanto, a amilase deve servir a propósitos nutricionais.

Ainda que as proteases estejam amplamente distribuídas na natureza, os microrganismos contribuem significativamente para a produção dessas enzimas. A facilidade de crescimento destes organismos e a não exigência de amplos espaços para seu cultivo favorecem a produção de proteases. De fato, as proteases de origem microbiana representam 40% das proteases comercializadas mundialmente (Godfrey & West, 1996; Gupta et al., 2002; Kumar & Takagi, 1999). Assim, como as proteases secretadas por bactérias e fungos oportunistas ou patogênicos mediam no hospedeiro uma série de processos patológicos (Maeda & Yamamoto, 1996), inclusive o crescimento de hifas através de proteínas fibrilares como colágeno e elastina (Reichard, 1998), as proteases de fungos antagonísticos apresentam, possivelmente, funções bem definidas nos processos de antagonismo. Desta forma, foi proposto caracterizar as atividades proteolíticas produzidas pelos isolados CEN 62 e CEN 93 de *D. pulvinata*, os quais se destacaram quanto à produção de proteases. Levando em consideração a variação de pH sofrida pelos dois isolados durante o crescimento em meio sintético contendo caseína 0,5%, foi observado que à medida que ocorria o crescimento do fungo, aumentava proporcionalmente o pH do meio de cultura, de 5,5 para 9,0 (CEN 62) e para 7,5 (CEN 93) (Figura 16).

As análises das atividades proteolíticas feitas nos sobrenadantes dos meios de cultura dos dois isolados mostraram que ambos possuem condições significativas de hidrolisar proteínas. O isolado CEN 62 apresentou maior atividade caseinolítica com 240 h de crescimento enquanto o isolado CEN 93 apresentou atividade significativa, porém inferior ao isolado CEN 62 com 192 h de cultivo (Figura 17). Modificando a temperatura e o tempo de reação foi detectado que os dois isolados [CEN 62 e CEN 93] apresentaram atividade caseinolítica significativas quando ensaiados a 50°C por até 80 minutos (Figs. 18 e 19).

O pH ótimo para ação proteolítica foi de 8,5 para o isolado CEN 62 e 8,0 para o isolado CEN 93 (Figura 20) podendo ser classificados como proteases alcalinas, possivelmente uma serinoprotease. É interessante notar que a produção desta enzima é induzida por parede celular ou componentes desta, como a quitina. Na natureza, a secreção desta protease deve ser induzida por um sinal proveniente ou presente na parede celular da célula antagonizada, neste caso, o fitopatógeno (De Marco et al., 2000a).

A temperatura ótima para a protease foi de 45°C, porém com valores significativos entre 25°C e 50°C, decrescendo de forma brusca quando aumentou a temperatura (Figura 21). Uma protease de *Streptomyces pactum* apresentou atividade entre temperaturas de 45°C a 75°C com atividade máxima a 65°C (Bockle et al., 1995), uma outra protease de *Streptomyces*

spp. apresentou temperatura ótima entre 45°C e 55°C (*Sampath et al.*, 1997). A protease dos dois isolados apresentou resistência pela temperatura semelhante a outras citadas na literatura.

Quando testadas quanto à termoestabilidade os dois isolados apresentaram atividades caseinolíticas melhores no tempo 0 h de pré-incubação a 37°C, decrescendo à medida que aumentava o tempo de pré-incubação das amostras (figs. 22 e 23).

A cromatografia do sobrenadante concentrado da cultura do isolado CEN 62 crescido na presença de caseína, em colunas de troca iônica de: DEAE-Sepharose (Fig.24), SP-Sepharose (Fig.26), e uma segunda DEAE-Sepharose (Fig. 29) resultou em uma preparação de protease que continha várias espécies proteicas (Figs. 30 e 32). Também para o isolado CEN 93 seguindo as mesmas condições do isolado CEN 62, as cromatografias resultaram em uma amostra não purificada (Figs. 31 e 32).

CONCLUSÕES

- 1 – Os dois isolados de *Dycima pulvinata* [CEN 62 e CEN 93] apresentaram diferentes capacidades de produção de enzimas: β -1,3-glucanases, amilases, quitinases e proteases.
- 2 – O isolado CEN 62 apresentou maiores níveis de atividade enzimática para todas hidrolases testadas se comparado com o isolado CEN 93, excetuando a atividade de amilase dextrinizante associada ao micélio.
- 3 – O crescimento no meio de cultura sintético contendo caseína a 0,5%, foi mais expressivo nos dois isolados [CEN 62 e CEN 93], quando comparado aos outros substratos testados.
- 4 – Os isolados CEN 62 e CEN 93 apresentaram melhor atividade proteolítica em pH alcalino coincidindo com o pH atingido pelos dois isolados no meio de cultura durante o crescimento.
- 5 – O isolado CEN 62 apresentou maior atividade proteolítica com 240 h de cultivo enquanto o isolado CEN 93 apresentou maior atividade proteolítica com 192 h de crescimento em meio de cultivo.
- 6 – Os dois isolados apresentaram temperatura ótima de 45°C, contudo tiveram atividades proteolíticas significativas entre 25°C e 50°C.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até o momento favorecerão:

- Comparar os níveis de proteases produzidas pelos dois isolados de *D. pulvinata*;
- Purificar as proteases, produzidas pelos dois isolados de *D. pulvinata*;
- Analisar a existência de correlação entre a capacidade de produção das proteases pelos isolados [CEN 62 e CEN 93] de *D. pulvinata* com a capacidade de controle do fitopatógeno *M. ulei* por estes dois isolados;
- Caracterizar bioquímica e molecularmente as proteases purificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANWAR, A. & SALEEMUDDIN, M. **Alkaline protease**: A review. *Bioresource Technology*, 1998. v.64, p. 75-183.

AZEVEDO, J.L. **Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas**. In: Bettioli, W. (Org.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA. 1991. p. 1-5.

BARRET, A. J. **Proteolytic enzymes**: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 1994. v.244, p. 1 – 15.

BARRET, A.J. **Proteolytic enzymes**: aspartic and metallopeptidases. *Methods in Enzymology*. 1995. p. 248: 183.

BARTINICKI-GARCIA, S. **Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi**. *Annual Review of Microbiology*. 1968. v.22, p. 87-108.

BENHAMOU, N. & CHET, I. **Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani***: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*, 1993. v.83, p. 1062-1071.

BERNFELD, P. **a and b amylases**. *Methods in Enzymology*, 1955. v.1, p. 149 – 158.

BETTIOLI, 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.

BETTIOLI, W. **Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas**. In: Campanhola, C. & Bettioli, W. (Ed.) *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2003. p. 191-215.

BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels**. *Electrophoresis*, 1987. v.8, p. 93-99.

BOCKLE, B.; GALUNSKY, B. & MULLER, R. **Characterization of a keratinolytic Serine proteinase from *Streptomyces pactum* DMS 40530**. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995. v.61 (10), p. 3705-3710.

- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical biochemistry, 1976. v.72, p. 248-254.
- BRENNER, S. **The molecular evolution of genes and proteinase: a talk of two serines.** Nature, 1998. v.334, p. 528-530.
- BRIGNANI NETO, F. et al. **Efeito de fungicidas sistêmicos no ciclo biológico de *Microcyclus ulei*, agente causal da queima da folha da seringueira (*Hevea spp.*).** Summa Phythopatologica 1991. v.17, p. 238-246.
- BULÉON, A. et al. **“Starch granules: structure and biosynthesis”.** International Journal of Biological Macromolecules, 1998. v.23, p.85-112.
- CABIB, E. **The synthesis and degradation of chitin.** Advances in Enzymology, 1987. v.59, p. 59-101.
- CHERNIN, L. et al. **Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens.** Journal of Applied and Environmental Microbiology, 1995. v.61, p.1720-1726.
- CHET, I. & BAKER, R. **Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil.** Phytopathology, 1980. v.70, p.994-998.
- 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. **Biological control of soil-borne plant-pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments:** In: Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens, Ed. Hornby. Wallingford: CAB International. 1990. p. 15-25
- 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, 1994. v.48, p. 37-43.
- DEACON, J.W. & BERRY, L.A. **Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens.** In: Tjamos, E.C.; Papavizas, G.C.; Cook, R. J. ed. Biological control of plant diseases. New York: Plenum Press, 1992. p.157-167.
- DEACON, J.W. **Structure and ultrastructure.** In: Modern Mycology, Third edition. 1997. p. 36-39.
- DEBACH, P. **Biological control of insect pests and weeds.** New York: Reinhold. 1964. p 844.
- DE LA CRUZ, J. et al. **Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*.** European Journal of Biochemistry, 1992. v.206, p.859-867.

DE LA CRUZ, J. et al. **Purification and characterization of an endo-b- 1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism.** Journal of Bacteriology, 1995. v.177, p. 6937 -6945.

DELMANDI, L.C. **Avaliação do potencial de uso do hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk & Curtis) no controle biológico do mal-das-folhas [*Microcyclus ulei* (P. Henn v.Arxx)] de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. Juss) Muell. Arg] em São José do Rio Claro – MT.** (Dissertação Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT. 2002.

DE MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FELIX, C.R. **Production of hydrolytic enzymes by two *Trichoderma* isolates showing antagonistic against the cocoa witches' broom fungus *Crinipellis pernicioso*.** In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 26., 1997, Caxambu, MG. Programa e resumos. 1997.

DE MARCO, J.L. et al. **Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por isolados de *Trichoderma harzianum* com potencial antagônico contra o agente (*Crinipellis pernicioso*) causador da “Vassoura-de-bruxa”.** In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6., 1998, Rio de Janeiro, RJ.. Anais. Rio de Janeiro, 1998. p.20.

DE MARCO, J.L. **Produção de hidrolases por isolados de *Trichoderma sp.* com potencial antagônico contra *Crinipellis pernicioso* e caracterização de uma quitinase e uma protease.** (Tese de doutorado). Universidade de Brasília – Brasília, DF. 1999.

DE MARCO, J.L.; FÉLIX, C.R. & LIMA, L.H.C. **Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo.** In: CONTROLE BIOLÓGICO, 2000a. v.2, p. 263-304.

DE MARCO, J.L. et al. **A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso* the causal agent of witches broom disease of cocoa.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000b. v.16, p. 383-386.

DE MARCO, J.L. & FÉLIX, C.R. **Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease.** BMC Biochemistry 3: 1-12. Disponível em <http://www//biomedcentral.com/1472-2091/3/3>. 2002.

ELAD, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. **Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*.** Canadian Journal of Microbiology, 1982. v.28, p. 719-725.

ELAD, Y.; BARAK, R. & CHIET, I. **Possible role of lectins in mycoparasitism.** Journal of Bacteriology, 1983. v.154, p.1431-1435.

ELAD, Y.; BARAK, R. & CHIET, I. **Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*.** Soil Biology and Biochemistry, 1984. v. 16, p.381-386.

FITZGERALD, P.M.D. et al. **Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type I protease and acetyl-pepstatin at 2.0 Å resolution.** Journal of Biological Chemistry, 1990. v.265, p. 14209-14219.

FUWA, H. **A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate.** J. Biochem, 1954. v.41, p. 583-603.

GASPAROTTO, L. et al. **Enfermidades da seringueira no Brasil.** Manaus; Embrapa - CPAA. Série Embrapa Circular Técnica, IV. 1990. p.169.

GASPAROTTO, L.; LIEBEREI, R.; TRINDADE, D.R. **Germinação de conídios de *Microcyclus ulei* e sua sensibilidade a fungicidas “In Vitro”.** Fitopatologia Brasileira, 1984. v.9, p.505-511.

GASPAROTTO, L. et al. **Doenças da seringueira no Brasil.** Brasília: Embrapa-SPI: Manaus: Embrapa - CPAA, 1997. p.168.

GODFREY, T. & WEST, S.I. **Introduction to Enzymology.** In: Industrial Enzymology. 2nd Ed., Macmillan Publishers inc., New York, N.Y. 1996. p. 2-8.

GONÇALVES, P. de S. et al. **Variabilidade genética da produção anual da seringueira: estimativas de parâmetros genéticos e estudo de interação genótipo x ambiente.** Bragantia, Campinas, 1990. v.49(2), p. 305-320.

GONÇALVES, P. de S. **Melhoramento genético da seringueira.** Circular Técnica - IAC. Campinas, 1995. p 42.

GOVIND, N.S. et al. **Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*.** Phytochemistry, 1981.v.20, p. 2483-2485.

GUPTA, R., BEG, Q.K. & LORENZ, P. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. v.59 (1), p. 15 – 32.

HARAN, S. et al. **Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism.** Phytopathology, 1996. v.86, p. 980-985.

HARMAN, G.E. et al. **Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase.** Phytopathology, 1993.v.83, p. 313-318.

HAKI, G.D. & RAKSHIT, S.K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review.** Bioresource Technology, 2003. v.89 (1), p.17-34.

HERSHKO, A. & CIENCHANOVER, A. **Mechanisms of intracellular protein breakdown.** Annual Review in. Biochemistry, 1982. v.51, p. 335-364.

INBAR, J. & CHET, I. **A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and its role in mycoparasitism.** Microbiology, 1994. v.140, p.651-657.

- JUNQUEIRA, N.T.V. & GASPAROTTO, L. **Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira.** In: Bettiol, W. Controle biológico de plantas. Jaguariúna: Embrapa - CNPDA, 1991. p.307-331.
- JUNQUEIRA, N.T.V. et al. **Potencial do fungo *Hansfordia pulvinata* no controle biológico do mal-das-folhas da seringueira.** Fitopatologia Brasileira, Brasília, 14, n. 2, p. 158. Resumos, 271. 1989.
- KUMAR, C.G. & TAKAGI, H. **Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint.** Biotechnological Advances, 1999. v.17, p. 561-594.
- KUNITZ, M. **Crystalline soybean trypsin inhibitor.** J. Gen. Physiol., 1946. v.29, p. 149-154.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, London. 1970. v.227, p. 680-685.
- LATUNDE-DADA, O. A. **Biological control of southern blight disease of tomato caused by *Sclerotium rolfii* with simplified mycelial formulations of *Trichoderma koningii*.** Plant Pathology, 1993. v. 42, p.522-529.
- LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L. & FELIX, C. R. **Enzimas Hidrolíticas Envolvidas no Controle Biológico por Micoparasitismo.** In: Controle Biológico. ED. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 2000. v. 2, p. 263-304.
- LIMA, L. H. C. et al. **Synthesis of a *Trichoderma* chitinase which affects the *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani* cell walls.** Folia Microbiologica, 1999. v.44, p.45-49.
- LIMA, L.H.C.; ULHOA, C.J. & FELIX, C.R. **Análises de enzimas hidrolíticas produzidas por isolados de *Trichoderma* sp.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 27., 1995, Ilhéus, BA. Anais. Ilhéus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 1995.
- LIMA, L.H.C.; ULHOA, C.J. & FELIX, C.R. **Ação da quitinase de *Trichoderma* sp. nos fitopatógenos *Sclerotium rolfii* e *Rhizoctonia solani*.** In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. Anais. Londrina: EMBRAPA-CNPDSO. 1996.
- LIMA, L.H.C. et al. **Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp and its action on *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani* cell walls.** Journal of General and Applied Microbiology, 1997.v. 43, p.31-37.
- LINDBERG, R.A. et al. **Alkaline protease from *Neurospora crassa*.** Journal of Biological Chemistry, 1981. v.256, p. 811-814.
- LORITO, M. et al. **Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan b-1,3-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*.** Phytopathology, 1994. v.84, p.398-405.
- MAEDA, H. & YAMAMOTO, T. **Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections.** Biological Chemistry Hoppe Seyler, 1996. v. 377, p.217-226.

MARQUES, J.R.. Transcrito do Jornal CEPLAC Notícias. 2000. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/seringueira.htm>>.

MELO, I.S. **Feasibility of classical biological control of plant diseases**. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 12., 1991, Rio de Janeiro, RJ. Plenary lectures and symposia. Symposium NBR 10 “Classical approaches of biological control”. Rio de Janeiro. 1991.

MELO, D.F. **Produção, armazenamento, estabilidade e eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* no biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira**. (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília – Brasília, DF. 2006.

MELLO, S.C.M. et al. **Métodos para Indução e Análise de Enzimas Micolíticas Secretadas por *Dicyma pulvinata***. Circular técnica, Brasília-DF, novembro. ISSN 1516-4349. 2002.

MELLO, S.C.M. et al. **Isolados de *Dicyma pulvinata* obtidos em um levantamento realizado nos seringais brasileiros**. Embrapa - Comunicado técnico – Brasília, DF. Setembro. ISSN 0102-0099. 2003.

MIGHELI, Q. et al. **Hypercellulolytic transformants of *Trichoderma longibrachiatum* are active in reducing pythium damping-off on cucumber**. In: Daniels, M.J., ed Advances in molecular genetics of plant-microb interactions. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. v.3

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, 1959. v.31, p.426-428.

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

PEREIRA, J.P. **Seringueira: formação de mudas, manejo e perspectivas no Noroeste do Paraná**. Instituto agrônômico do Paraná. 1992. p. 1-60. (Circular 70).

PHADATARE, S., RAO, M. & DESHPANDE, V. **A serine alkaline protease from the fungus *Conidiobolus coronatus* with a distinctly different structure than the serine protease subtilisin Carlsberg**. Archives of Microbiology, 1997. v.166, p. 414-417.

PIETRO, R.C.L.R. & SAID, S. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Enzimas como agentes biotecnológicos. 2004. p. 1-7.

PITSON, S.M., SEVIOUR, R.J. & MCDUGALL, B.M. **Non-cellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation**. Enzyme Microb.Technol., 1993. v.15, p. 178-192.

RAO, M. B. et al. **Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases**. **Microbial**. Molecular Biology Review, 1998. v.62 (3), p. 597 – 635.

REICHARD, U. **The significance of secretory and structure-associated proteases of *Aspergillus fumigatus* for the pathogenesis of invasive aspergillosis.** Mycoses, 1998. v. 41, p. 78-82.

RIDGWAY, R.L. **Biological pest control.** Yearbook of Science and the Future. [S.I]: Encyclopedia Britannica, Inc. 1981. p.92-105.

SAHAI, A. S. & MANOCHA, M.S. **Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction.** FEMS Microbiology Reviews, 1993. v.11, p. 317-338.

SAMPATH, P.; SUBRAMANIAN, C. & CHANDRAKASAN, G. **Extracellular proteases from *Streptomyces* spp. G₁₅₇: purification and characterization.** Biotechnology Applied Biochemistry, 1997.v.26, p. 85-90.

SANTOS, A.F & PEREIRA, J.C.R. **Eficiência de fungicidas no controle do *Microcyclus ulei* in vitro e in vivo.** Revista Theobroma. 1985. v.15, p. 185-190.

SANTOS, C.E.E.; SILVEIRA, A.A. & MELLO, S.C.M. **Avaliação de isolados de *Dicyma pulvinata* quanto ao potencial de biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira.** In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina, Anais... Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná. 2001. p. 699-701.

SIELECKI, A. R. et al. **Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 a resolution.** Journal of Molecular biology, 1991. v. 219, p. 671-692.

STIRLING, J.; COOK, G. & POPE, A. **Chitin and its degradation.** In: fungal wall and hyphal growth. Bristish Mycological Society. 1979. p. 169-188.

TAVARES, E.T. **Variabilidade genética de isolados do micoparasita *Dicyma pulvinata* obtidos em lesões provocadas por *Microcyclus ulei* nos seringais brasileiros.** (Dissertação de mestrado). Universidade de Brasília – Brasília, DF. 2001.

TIMMIS, K.N. **Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes.** Annual Review of Microbiology, 1994. v.48, p.525-557.

WEAVER, L.H., KESTER, W.R. & MATTHEWS, B.W. **A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with thermolysin.** A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of structures. Journal of Molecular Biology, 1977. v. 114, p. 119-132.