

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO *IN VITRO* E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE ISOLADOS *Trichoderma stromaticum* e *Crinipellis perniciososa*

Tâmara São Paulo Vidal¹
Camila Carvalho Pimentel da Cruz e Joice Andréia Aguiar Santos Nascimento²
Leandro L. Loguercio³
Alan W. V. Pomella⁴
Renato Delmondez Castro⁵
Eduardo Aquino Ximenes⁶

RESUMO: A vassoura-de-bruxa é uma doença causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciososa* que destrói a cacauicultura no Brasil, chegando a provocar perdas de até 100% na produção da planta. O fungo micoparásita *Trichoderma stromaticum* tem sido considerado um dos mais potentes agentes de controle biológico deste fitopatógeno. Estudos *in vitro* mostraram o seu crescimento pareado ao *Crinipellis perniciososa*, entretanto as bases moleculares do processo de micoparasitismo ainda são desconhecidas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento dos isolados de *Trichoderma stromaticum* e a quantificação das proteínas produzidas por *Trichoderma stromaticum* em presença de *Crinipellis perniciososa* resultantes dos filtrados obtidos na construção da curva de crescimento. Para o crescimento dos isolados, utilizou-se meio TLE líquido, contendo micélio do hospedeiro inativo por temperatura. Para a avaliação da indução do metabolismo envolvido no micoparasitismo de *Crinipellis perniciososa* foi construída uma curva para condições de crescimento e analisado o conteúdo global de proteínas secretadas (incluindo a produção de enzimas hidrolíticas de interesse), que foram quantificadas por espectrofotometria. Os resultados demonstram claramente a relação de antagonismo existente entre o patógeno de cacau e seu controlador biológico. Os resultados representam uma contribuição para o avanço do entendimento das interações entre o cacauzeiro, o patógeno e o antagonista, possibilitando novos estudos sobre o controle biológico de *Crinipellis perniciososa* por meio do antagonismo de *Trichoderma stromaticum*.

Palavras-chave: Vassoura-de-bruxa; *Crinipellis perniciososa*; *Trichoderma stromaticum*

INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacauzeiro (*Theobroma cacao*) é uma doença causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciososa* (Stahel) Singer, o qual tem causados sérios danos à cacauicultura no Brasil. Após permanecer restrita à região Amazônica, a doença foi registrada, em 1989, no sul da Bahia, região responsável por 85% da produção brasileira de cacau. A doença, nesta área, atinge atualmente quase a totalidade das fazendas de cacau, com severos

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas e Estagiária Bolsista do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente - LEMA/UCSal, tamarasaopaulo@yahoo.com.br. Orientador: Márcio Gilberto Cardoso Costa, Doutor em Genética e Melhoramento. Co-orientadora: Luzimar Gonzaga Fernandez, Doutora em Biologia Molecular Estrutural, Coordenadora e Pesquisadora do LEMA/UCSal, Professora do ICS/UFBA. Pesquisa com o apoio da FAPESB.

² Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas e Estagiária Bolsista FAPESB.

³ Professor, Doutor da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA.

⁴ Almirante Cacau / M&M MARS, Itajuípe-BA.

⁵ Doutor em Fisiologia Vegetal, Pesquisador do LEMA/UCSal.

⁶ Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).



prejuízos econômicos, sociais e ecológicos, chegando a provocar perdas de até 100% na produção da planta. Em condições naturais, a disseminação da doença resulta da dispersão abiótica de basidiósporos uninucleados liberados dos basidiomas formados na superfície externa dos órgãos do hospedeiro. Os basidiósporos podem infectar qualquer tecido meristemático em crescimento, como extremidades de botões germinativos, flores e frutos da planta do cacauzeiro. Dentre as espécies do gênero *Trichoderma*, *T. harzianum*, *T. viride* e *T. longibrachiatum* tem sido descritas como micoparasitas de *C. pernicioso* (HERBBAR *et al.*, 1999; AZEVEDO; DE MARCO; FELIX, 2000; DE MARCO *et al.*, 2000; KRAUSS; SOBERANIS, 2002). Recentemente, uma nova espécie de *Trichoderma* foi identificada, denominada *Trichoderma stromaticum* (SAMUELS *et al.*, 2000). A utilização do fungo saprófita de solo, micoparasita *Trichoderma stromaticum* tem sido considerada um dos mais potentes agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos. O micoparasitismo de *Trichoderma* é um processo complexo, em que o fungo cresce quimiotropicamente em direção ao hospedeiro, fixando-se e enrolando-se em torno de suas hifas, penetrando o micélio do hospedeiro após a degradação parcial da parede celular (CHET, 1987, p.137-160). Especula-se que a atividade micoparasita de *Trichoderma spp.* pode ser devido à produção de antibióticos (GHISALBERTI; SIVASITHAMPARAM, 1991), competição por nutrientes (CHET, 1987), produção de enzima envolvida na hidrólise da parede celular (SCHIRMBÖCK *et al.*, 1994) ou uma combinação dessas atividades antagonistas (NEETHLING; NEVALAINEN, 1995). Estudos *in vitro* mostraram o seu crescimento pareado ao *C. pernicioso*, entretanto as bases moleculares do processo de micoparasitismo ainda são desconhecidas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento dos isolados de *Trichoderma stromaticum* e a quantificação das proteínas produzidas por *Trichoderma stromaticum* em presença de *Crinipellis pernicioso* resultantes dos filtrados obtidos na construção da curva de crescimento.

METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA), na Universidade Católica do Salvador (UCSal). Após o recebimento dos isolados (ALF 42 isolado de *Crinipellis pernicioso* e ALF 56, 64, 323, 667, 677 isolados de *Trichoderma stromaticum*), foi feita a preservação destes com a retirada de um disco de micélio de cada placa e colocado num eppendorf, contendo 1,5 mL de água destilada estéril, sendo armazenado em temperatura ambiente (*C. pernicioso*) e em geladeira (*T. stromaticum*).

A manutenção de *C. pernicioso* foi feita com a retirada de um disco de micélio de cada placa e colocado no centro de uma placa de Petri, contendo meio BDA (Tabela 01), incubado a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por 10-15 dias, e armazenado em temperatura ambiente por 30 dias. A manutenção de *T. stromaticum* foi feita com a retirada de um disco de micélio de cada placa e colocado no centro de uma placa de Petri, contendo meio BDA, incubado em estufa a 28° C por 3-4 dias, sendo posteriormente armazenado em geladeira por 30 dias. (a manutenção era realizada quando a placa completava 30 dias).

Tabela 01- Composição do meio BDA

ddH ₂ O	600mL
Meio BDA pronto	31,2g
Completar volume com ddH ₂ O	200mL



Para a construção da curva de crescimento, foi conduzida a produção de micélio de *C. pernicioso*, retirando-se quatro discos de micélio de uma placa de cultura deste, inoculando-se em seis frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 150mL de meio MYG líquido (Tabela 02), e três discos de micélio em frascos de 100 mL. Foram incubados sob agitação em shaker a 120 rpm, em temperatura ambiente (25 °C) e fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias. Coletou-se a massa micelial por lavagem e filtração em papel de filtro, seguido de liofilização e armazenamento a -20 °C. Foi feita a contagem de esporos acrescentando-se 10 mL de água estéril em uma placa de cada isolado para que ocorresse a liberação de esporos e, com o auxílio da ponteira, os esporos foram sendo liberados do meio BDA, estes foram coletados com auxílio de pipeta em um eppendorf de 15 mL. Destas soluções, foram feitas três alíquotas de 1000 µL de soluções diluídas a 1:20, 1:50 e 1:100. Antes da retirada destes esporos para a contagem, foi feita uma homogeneização desse concentrado, utilizando Tween-20. Na Câmara de Neubauer, depositaram-se, nos canais laterais, 200 µL da solução, procedendo à contagem no microscópio com objetiva de 40x. Com a finalidade de observar o crescimento de *T. stromaticum* em meio líquido, houve produção da sua massa micelial, seguindo o mesmo procedimento para a produção de micélio de *C. pernicioso*. Utilizou-se o isolado ALF 323, pois este apresentou maior quantidade de esporos. Foi adicionado na placa 100 mL de água autoclavada sendo os esporos coletados com o auxílio da ponteira. Essa solução de esporo foi diluída 1:20, retirando-se uma alíquota de 1 mL que foi inoculado no meio MYG líquido armazenando no shaker.

Tabela 02- Composição do meio MYG

ddH ₂ O	80mL
Extrato de Malte	0,5g
Extrato de Levedura	0,25g
Glicose	1g
pH	6,2
Completar volume com ddH ₂ O	20mL

A curva de crescimento foi iniciada com o preparo do meio TLE (Tabela 03). Ao volume de 250 mL de TLE foi adicionado 1 mL da solução de esporos (anteriormente descrita) em erlenmeyer de 500 ml e, em seguida, colocou-se no shaker por seis dias. Foram filtrados, em papéis de filtro previamente pesados, 10 mL deste nos seguintes tempos: 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas. Os papéis contendo o filtrado foram colocados em estufa a 90 °C durante 24 horas e posteriormente pesados. A diferença entre os pesos inicial e final indicou a quantidade de micélio produzido pelo *T. stromaticum* nos diferentes tempos. O líquido resultante da filtração foi armazenado em frasco coletor universal a uma temperatura de -20 °C.

**Tabela 03-** Composição do meio TLE para 1,0 L de solução.

ddH ₂ O (mL)	800
Peptona (g)	1,0
Uréia (g)	0,3
KH ₂ PO ₄ (g)	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	1,4
MgSO ₄ .7H ₂ O (g)	0,3
CaCl ₂ .2H ₂ O (g)	0,2
Elementos Traços (mL)	1,0
Glicose (g)	0,2
Micélio de <i>Crinipellis</i> liofilizado (mL)	5,0
pH	7,3
Completar volume com ddH ₂ O (mL)	200

Para a avaliação do crescimento de *Thichoderma stromaticum* pareado com *Crinipellis pernicioso*, foi distribuído meio BDA em 25 placas de Petri (cinco para cada isolado de *T. stromaticum*). Foi retirado 1 disco de micélio de cada isolado de *T. stromaticum* e 1 disco de micélio de *C. pernicioso*, que foram inoculados em lado opostos da placa de Petri a uma distância de aproximadamente 2 cm dos bordos das placas. Todas as placas foram armazenadas em temperatura ambiente em presença de luz fluorescente permanente. Após 5 dias da inoculação, realizou-se a 1ª medição do ponto de maior crescimento do *T. stromaticum* em presença de *C. pernicioso*. Dois dias após, foi realizada a segunda medição. Este estudo visou analisar a capacidade antagonista de isolados de *T. stromaticum*.

Foi preparado o reagente de Bradford para a dosagem de proteínas da solução resultante da filtração do micélio. Esse preparo pode ser descrito da seguinte forma:

1. dissolveu-se 100mg de Comassie Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, mantendo por agitação magnética por 2 horas;
2. adicionou-se lentamente 100mL de ácido fosfórico 85%, agitando por mais 2 horas;
3. deixou-se a solução em repouso por 24 horas;
4. completou-se o volume com água destilada para 1000 mL;
5. a solução foi colocada em repouso por 24 horas e depois foi filtrada em ultrafiltro Millipore (0,45 um de duas camadas);
6. armazenou-se em frasco escuro em geladeira.

Em tubos de ensaio, foram colocados 100 µL dos filtrados e 1 mL do reagente de Bradford. Estas amostras foram lidas no espectrofotômetro a 595 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da curva de crescimento dos isolados de *Trichoderma stromaticum*:

Foram inoculados 3×10^6 esporos de cada isolado em meio TLE líquido contendo 0,5% da parede celular de *C. pernicioso*. As amostras submetidas à pesagem do micélio seco apresentaram curvas de crescimento representadas na Figura 01. O resultado dos dois experimentos realizados para calcular a curva de crescimento dos isolados do *T. stromaticum*, na presença de *C. pernicioso*, demonstrou que os valores médios foram: ALF 56 teve seu crescimento máximo as 120 horas; o ALF 64, em 72 horas e o ALF 323, em 120 horas (Figura 01).

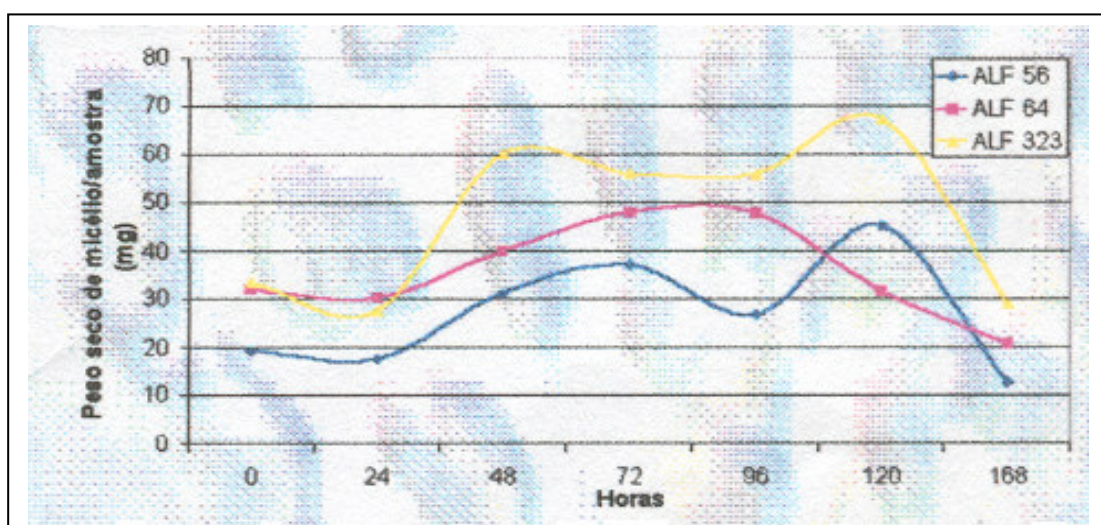


Figura 01 - Curva de crescimento de alguns isolados de *T. stromaticum*, onde representa a média de dois experimentos independentes.

Avaliação *in vitro* da capacidade antagônica de isolados de *Trichoderma stromaticum*:

Através do crescimento *in vitro* de *T. stromaticum* pareado com *C. pernicioso*, mediu-se o diâmetro dos isolados antagonistas, obtendo-se uma média não significativa no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Turkey (Figura 02). A curva de crescimento revelou que os isolados ALF 667 e ALF 677 tiveram o seu crescimento máximo em 96 horas.

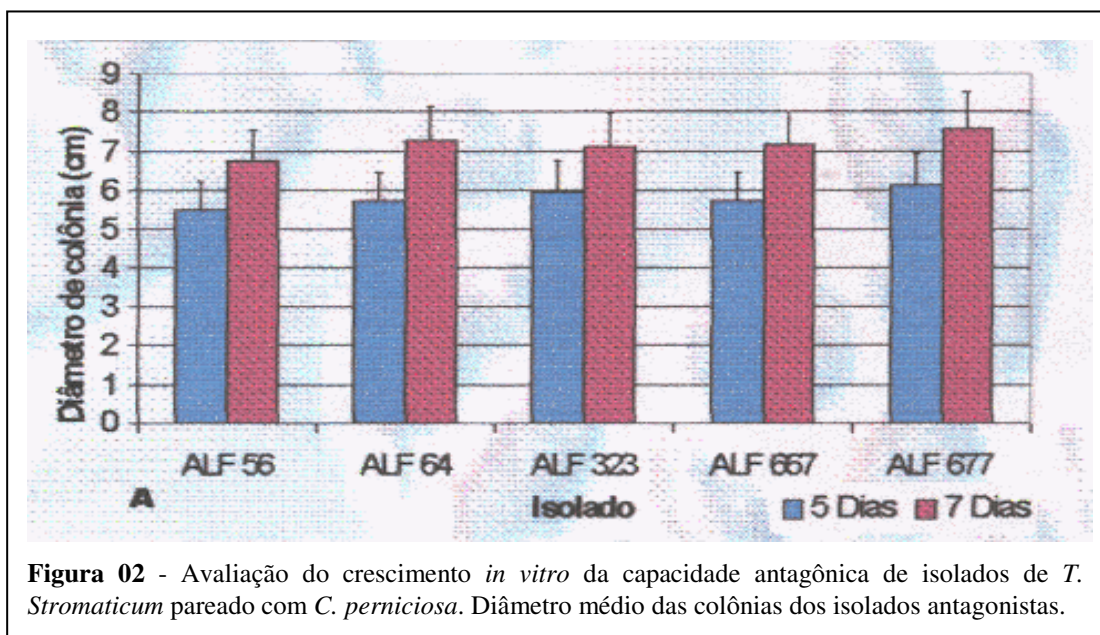


Figura 02 - Avaliação do crescimento *in vitro* da capacidade antagonista de isolados de *T. Stromaticum* pareado com *C. pernicioso*. Diâmetro médio das colônias dos isolados antagonistas.

A análise das proteínas produzidas pelos isolados 56, 64, 323, 667 e 677 de *T. Stromaticum* em presença de *C.pernicioso* foi através da medida de absorvância dos filtrados. Os resultados, em termos de absorvância medida, estão representados na Figura 03, para os isolados 56, 64 e 323 e na figura 04, para os isolados 667 e 677. As absorvâncias das proteínas presentes no filtrado dos isolados 667 e 677 variaram entre 0,02 a 0,21, não havendo uma diferença significativa entre os valores de absorvância para os dois isolados. Entretanto, para os isolados 56, 64 e 323, as absorvâncias variaram entre 0,04 a 0,59 evidenciando uma maior produção de proteínas por estes isolados, especificamente pelo isolado 323.

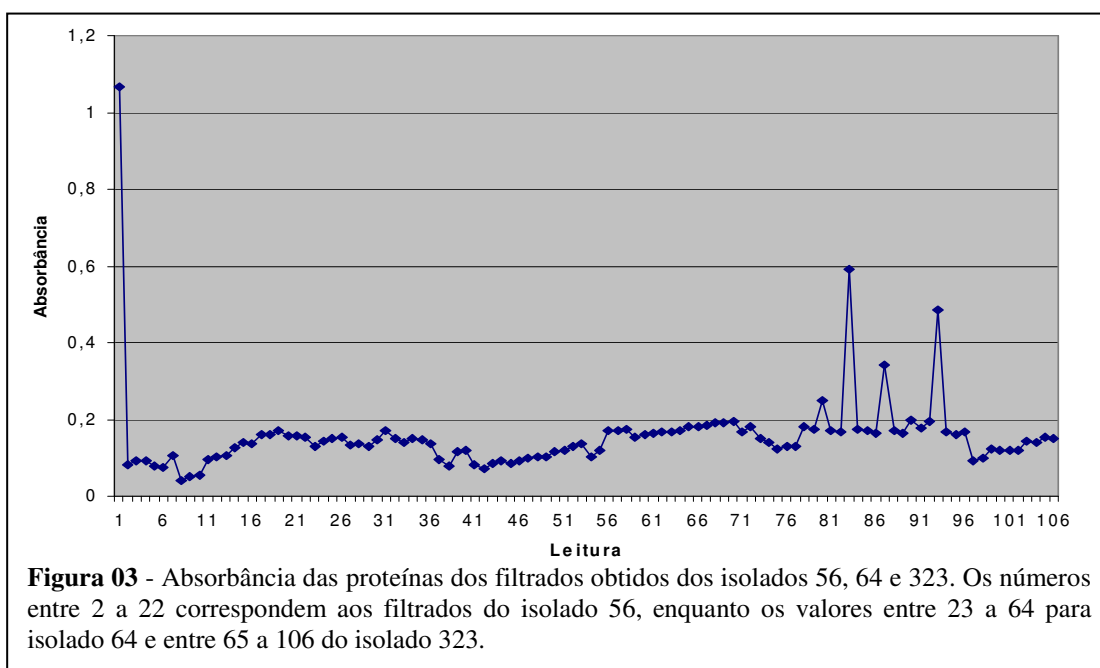
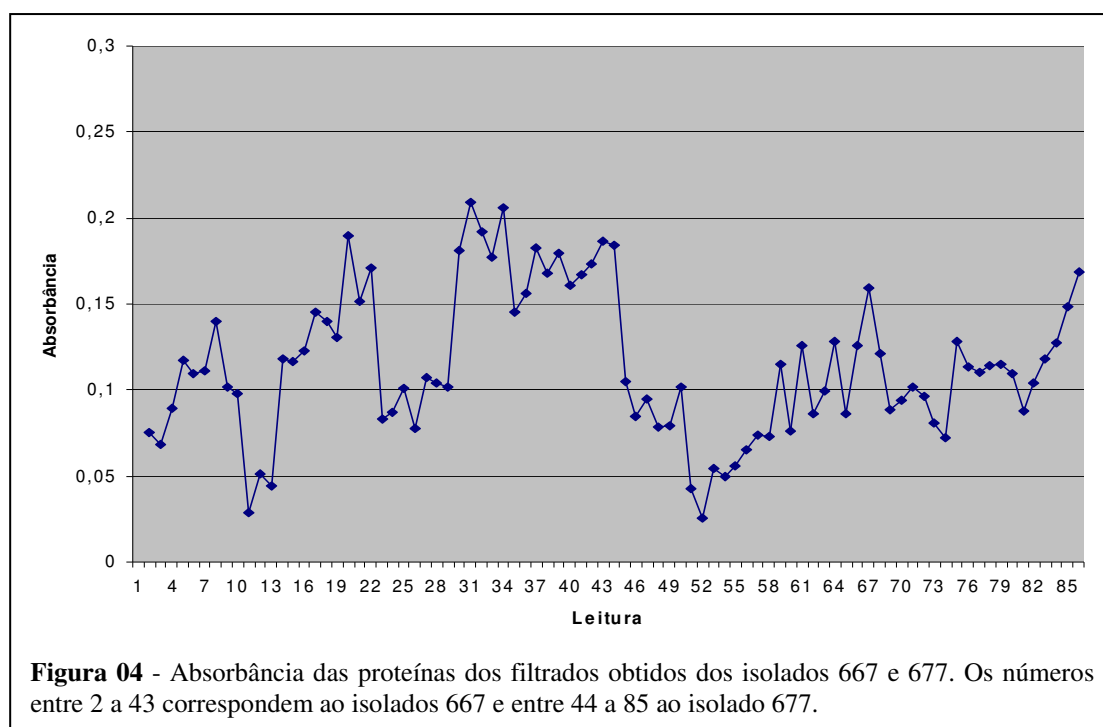


Figura 03 - Absorvância das proteínas dos filtrados obtidos dos isolados 56, 64 e 323. Os números entre 2 a 22 correspondem aos filtrados do isolado 56, enquanto os valores entre 23 a 64 para isolado 64 e entre 65 a 106 do isolado 323.



CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas até o presente momento, constatou-se que a fase exponencial de crescimento dos isolados de *T. stromaticum* testados variou de 24 a 120 horas, sendo que ALF 323 apresentou a maior massa micelial dentre os isolados testados.

Todos os isolados de *T. stromaticum* testados apresentaram elevado grau de antagonismo contra *C. pernicioso*, não havendo diferença significativa no crescimento linear das colônias entre os isolados quando pareados com o patógeno. A absorbância de proteínas nos filtrados provenientes dos isolados 56, 64 e 323 foram superiores os dos isolados 667 e 677, indicando uma maior concentração de proteínas nestes filtrados, especificamente do isolado 323.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, A. M. C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **FEMS Microbiology Letters** 188: 171-175, 2000.

CHET, I. *Trichoderma* applications, mode of action and potencial as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. I: CHET, I. (Ed). **Innovative approaches to plant diseases**. New york : Jonh Wiley and Sons, 1987. pp.137-160.



DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V.; FELIX, C. R. 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 and Biotechnology** 16: 383-386, 2000.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma spp.* **Soil Biology and Biochemistry** 23: 1011-1020, 1991.

HERBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; KRAUSS, U; SOBERANIS, W.; LAMBERT, S.; MACHADO, R.; DESSIMONI, C.; AITKEN, M. Biocontrol of cocoa diseases in Latin America – Status of field trials. In: KRAUSS, U; HERBBAR, K. P. (Eds.). **Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases with Special Reference to Fungal Diseases of Cocoa**. Costa Rica: CATIE, 1999. pp. 19-28.

KRAUSS, U; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control** 24: 82-89, 2002.

NEETHLING, D.; NEVALAINEN, H. Mycoparasitic species of *Trichoderma* produce lectins. **Canadian Journal of Microbiology** 42: 141-146, 1995

SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HERBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C. N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp.nov.; a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Micological Research** 104: 760-764, 2000.

SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y. L.; HAYES, C. K.; ARSIAN-ATAC, I; SCALA, F.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptabiol antibiotics: molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungus. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 4364-4370, 1994.