

Atividade proteolítica de fungos fitopatogênicos isolados de feijoeiro comum

Proteolytic activity of phytopathogenic fungi isolated from common bean

Ana Carla da Silva Santos¹, Agatha Rocha de Siqueira Silva², Dandara Wenne Teixeira Santana Lima³, Geizquiele de Lima¹, Rosineide da Silva Lopes³, Antonio Felix da Costa³, Luciana Gonçalves de Oliveira^{3*}

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

²Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

³Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Av. Gal. San Martin, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

*autor correspondente

✉ lugoliveira@gmail.com

RESUMO: As proteases podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção pelo fungo. Este trabalho objetivou avaliar a produção qualitativa de protease em *Curvularia eragrostidis*, *Fusarium equiseti*, *F. lateritium*, *F. oxysporum* f sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* isolados de feijoeiro comum. Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio Agar caseína do leite e incubados em BOD ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ e $80 \pm 10\%$ UR) por 96 h. A atividade proteolítica foi determinada pelo Índice de Relação Enzimática (IRE). O fungo *F. oxysporum* f sp. *phaseoli* apresentou maior IRE (1,23), seguido de *F. equiseti* (1,16), *F. lateritium* (1,11), *C. eragrostidis* (1,10) e *S. rolfsii* (1,06). Não foi observado halo de degradação para protease em *M. phaseolina*.

PALAVRAS-CHAVE: Protease, fungos de solo, patógenos de feijão.

ABSTRACT: *Proteases can act on the protein hydrolysis of the membrane and cell wall of host plants by facilitating penetration and infection by fungi. In this study, we aimed to assess the qualitative production of protease in Curvularia eragrostidis, Fusarium equiseti, F. lateritium, F. oxysporum f sp. phaseoli, Macrophomina phaseolina, and Sclerotium rolfsii isolated from common bean. The fungi were inoculated in Petri dishes containing milk Agar casein and incubated in BOD ($26 \pm 1^\circ \text{C}$ and $80 \pm 10\% \text{RH}$) for 96 h. Proteolytic activity was determined by Enzyme Relation Index (ERI). The fungus F. oxysporum f sp. phaseoli presented the highest ERI (1.23), followed by F. equiseti (1.16), F. lateritium (1.11), C. eragrostidis (1.10), and S. rolfsii (1.06). No degradation halo was observed in M. phaseolina.*

KEYWORDS: Protease, soil fungi, pathogens of beans.

Proteases são enzimas hidrolíticas que podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção pelo microrganismo (TREMACOLDI, 2009). Entre os microrganismos fitopatogênicos, muitos produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas, exercem um importante papel na patogênese (VALUEVA; MOSOLOV, 2004). Entre esses organismos, os fungos ocupam um lugar de destaque, tendo em vista a grande variedade de enzimas proteolíticas que são capazes de produzir. Assim, a produção de proteases tem sido estudada com várias finalidades, como a de correlacioná-las com os processos de especificidade, patogenicidade e virulência (TIAGO; SILVA, 2007).

Nesse sentido, este trabalho objetivou avaliar a produção qualitativa de proteases de *Curvularia eragrostidis* (Henn.), *Fusarium equiseti* (Corda), *F. lateritium* (Nees), *F. oxysporum* f sp. *phaseoli* (J.B. Kendr. & W.C. Snyder), *Macrophomina phaseolina* (Tassi) e *Sclerotium rolfsii* (Saccardo) isolados de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), provenientes de diferentes localidades do Estado de Pernambuco, que apresentavam sintomas de doenças.

Depois do cultivo, identificação e purificação das colônias isoladas, discos de cinco milímetros de diâmetro de colônia foram transferidos para placas de Petri, contendo meio Ágar caseína do leite (LACAZ et al., 2002), e incubados em BOD (26 ± 1 °C e $80 \pm 10\%$ UR) por 96 h, em três repetições por isolado.

Posteriormente, adicionou-se às placas solução de ácido tricloroacético 10% (TCA) para revelação dos halos de degradação. A atividade proteolítica foi determinada pelo Índice de Relação Enzimática (IRE = D/d), em que D corresponde à soma do diâmetro total da colônia com o diâmetro do halo de degradação e d equivale ao diâmetro da colônia sem o halo.

A produção de proteases pelos fungos tornou-se evidente durante a degradação do meio específico em *F. oxysporum* f sp. *phaseoli*, que apresentou maior IRE (1,23), seguido de *F. equiseti* (1,16), *F. lateritium* (1,11), *C. eragrostidis* (1,10) e *S. rolfsii* (1,06) (Tabela 1). De acordo com Silva et al. (2011), observou-se atividade proteolítica em *F. lateritium* (IRE=1,02) e *F. oxysporum* (IRE=1,14) isolados do solo de sistemas agroflorestais no município de Bom Jardim (PE). Enquanto Rodarte et al. (2011) evidenciaram atividade proteolítica em *F. lateritium*, isolado de grãos de café (*Coffea arabica*), e Bezerra et al. (2012) relataram atividade proteolítica em *F. lateritium* encontrado em associação endofítica com a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*). Segundo Tan e Zou (2001), microrganismos endofíticos produzem enzimas extracelulares hidrolíticas como parte de seu mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro contra a invasão microbiana e/ou para obter nutrientes do solo.

Rodarte et al. (2011) não constataram a produção de protease por *F. equiseti*, isolado de grãos de café (*Coffea arabica* L.), em substrato caseína do leite; resultados que divergem dos encontrados no presente estudo.

Tabela 1. Atividade proteolítica de espécies de fungos fitopatogênicos ao feijoeiro comum após incubação em meio caseína do leite.

Espécies de fungos	IRE
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,23
<i>Fusarium equiseti</i>	1,16
<i>Fusarium lateritium</i>	1,11
<i>Curvularia eragrostidis</i>	1,10
<i>Sclerotium rolfsii</i>	1,06

IRE – Índice de Relação Enzimática.

Luz, Silva e Silveira (2006), com o objetivo de detectar a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por fungos endofíticos, provenientes de plantas sadias de maracujazeiro-amarelo, não identificaram atividade proteolítica em um isolado do gênero *Curvularia* Boedijn, enquanto que Silva et al. (2011) constataram atividade amilolítica, celulolítica e proteolítica em *Curvularia pallescens*.

Não há muitos registros relatando a atividade proteolítica em *S. rolfsii*, quando seria pertinente caracterizá-lo quanto a sua potencialidade na produção dessas enzimas, uma vez que forneceria dados a respeito dos processos de patogenicidade desse fungo, e a respeito da possibilidade de empregá-lo em processos biotecnológicos com aplicação industrial.

Para *M. phaseolina*, no presente estudo, não se evidenciou halo de degradação para proteases, enquanto que Schinke e Germani (2012) detectaram halo indicando hidrólise da caseína, em 11 de 13 isolados de *M. phaseolina*. A explicação para a divergência quanto à produção ou não de proteases por *M. phaseolina* pode estar associada à variabilidade genética dos isolados.

As referências esparsas sobre as proteases produzidas por *M. phaseolina* fazem alusão também à variabilidade na sua detecção. De uma maneira geral, estudos sobre as enzimas extracelulares produzidas por *M. phaseolina* são poucos, e os mais recentes têm focado a produção de celulases e endoglucanases (SCHINKE; GERMANI, 2012).

De maneira geral, os resultados obtidos indicam que as espécies testadas apresentaram atividade proteolítica sobre o substrato caseína do leite, apresentando assim potencial para a produção de proteases, com exceção do isolado de *M. phaseolina*, no qual não se evidenciou halo de degradação.

Referências

- BEZERRA, J. D. P. et al. Richness of endophyticfungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 1989-1995, 2012. PMID:22806020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-1001-2>
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier Press, 2002. 1104 p.
- LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B. Atividade Enzimática de Fungos Endofíticos e Efeito na Promoção do Crescimento de Mudanças de Maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006.
- RODARTE, M. P. et al. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.
- SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Screening Brazilian *Macrophomina phaseolina* isolates for alkaline lipases and other extracellular hydrolases. **International Microbiology**, Barcelona, v. 15, p. 1-7, 2012.
- SILVA, D. C. V. et al. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 607-610, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042011000400014>

- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, London, v. 18, p. 448-459, 2001. <http://dx.doi.org/10.1039/b100918o>
- TIAGO, P. V.; SILVA, R. J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não cuticulares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 26-30, 2007.
- TREMACOLDI, C. R. **Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas**. Belém: Documentos Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 44 p.
- VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004. PMID:15627384. <http://dx.doi.org/10.1007/s10541-005-0015-5>

Recebido: 30/12/2012
Aprovado: 28/09/2013