



**Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular**

**PRODUÇÃO DE HIDROLASES PELO FUNGO *Dicyma pulvinata* , E
PURIFICAÇÃO DE UMA BETA-GLUCANASE DO ISOLADO CEN62**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia
Molecular

Daniel Paiva Agostinho
Aluno

Carlos Roberto Felix
UnB
Orientador

João Batista Tavares da Silva
Embrapa
Co-orientador

Brasília – DF
2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Felix

Co-Orientador: Prof. Dr. João Batista Tavares da Silva

Banca Examinadora

Profa. Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello (Cenargen/Embrapa) - Examinador Externo

Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa(CEL/UnB) - Examinador Interno

Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas (CEL/UnB) - Suplente

Prof. Dr. Carlos Roberto Felix (CEL/UnB) - Orientador

Este trabalho é dedicado a meu avô (*in memoriam*) Antônio Raimundo de Paiva, filho de Antônio Basílio de Paiva. Um “homem especial” que me ensinou o verdadeiro valor da determinação e amor à vida, mesmo quando não havia mais uma vida a ser vivida. Amém especial.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, por todo o apoio incondicional que me foi dado e por todo amor que recebo de vocês diariamente.

A minha irmã, por todo companherismo e amizade.

A Ana Cláudia, por todo amor e por toda a paz que você me passa, e pela paciência que você teve nos períodos mais difíceis.

Aos meus amigos, que são meus irmãos aos meus olhos, Saulo, Marciano, Gil, , Rafael Burtet ,Wilson, Manoel e Vítor, por toda amizade .

À Mariana, que tanto me ajudou nessa etapa.

Aos amigos que fiz no laboratório de Biologia Molecular

Aos colegas do laboratório de Enzimologia, Yara, Danielle, Leonora, Marly, Beatriz, Félix Siqueira, Pedro, Fernanda.

Às verdadeiras “chefes” do laboratório de Enzimologia, Marísia “General” Cortês e Margareth “Bum” Gomes.

Aos professores Fernando Araripe, Lídia Pepe e Janice Lisboa, pelo apoio nesse ou em outros projetos realizados no decorrer deste mestrado.

À professora Regina Buani, por todo apoio e orientação no início deste trabalho.

Ao professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho por toda atenção e apoio no laboratório de Enzimologia.

Ao professor Carlos Roberto Felix, por ter me aceito sob sua orientação durante essa importante etapa da minha vida, e por todas as oportunidades de aprendizado a que tive acesso.

À CAPES por ter me concedido a bolsa de mestrado, fornecendo o apoio financeiro imprescindível para a realização deste trabalho de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos durante a fase de execução deste trabalho A todos os meus profundos e sinceros agradecimentos.

Resumo

A seringueira (*Hevea* spp.) é uma planta nativa da região amazônica, da qual se extrai o látex para a fabricação da borracha natural. O Brasil já foi o maior produtor mundial de látex, e este já foi responsável por 40% das exportações brasileiras. Esta planta é suscetível ao ataque do fitopatógeno *Microcyclus ulei*, causador do mal das folhas da seringueira, que é também endêmico da região amazônica e o principal responsável pela queda de produção de látex na América Latina e perda do mercado para países asiáticos como Sri Lanka e Malásia. Entretanto, surgiu dentro deste contexto o fungo micopatógeno *Dicyma pulvinata* que apresenta alta capacidade de controle do fitopatógeno *M. ulei*. Considerando esse fato, *D. pulvinata* pode ser utilizado como uma ferramenta para o controle biológico do mal das folhas da seringueira.

Neste trabalho foi analisada a capacidade de produção de glicosil hidrolases (β -1,3-, β -1,3-1,4- e β -1,4-glucanase e quitinase) por dois isolados CEN62 e CEN93, que haviam demonstrado, em estudos anteriores, serem bons antagonistas do fitopatógeno *M. ulei*. Assim, foi iniciado um projeto de avaliação da capacidade de produção dessas enzimas por estes dois isolados, e a caracterização de suas propriedades bioquímico-moleculares.

Os dois isolados demonstraram capacidades de produção das enzimas β -1,3-, β -1,3-1,4-glucanase e quitinase. No entanto, apenas o isolado CEN62 apresentou atividade de β -glucanase no sobrenadante do meio de cultura. Nenhum dos dois isolados secretou atividade de quitinase. Entretanto, a atividade de quitinase significativa foi encontrada associada ao micélio. Não foi possível, no entanto, a identificação de moléculas relacionadas a essa atividade, quer seja procedendo a lise do micélio na presença de detergente, quer procedendo a lise por sonicação.

Assim, foi escolhido o sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 para etapas posteriores de purificação, por apresentar uma atividade de β -1,3-glucanase.

O sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 foi então caracterizado bioquimicamente, observando-se que a atividade de β -1,3-glucanase teve um máximo a 60°C e pH 5,5, e a atividade de β 1,3-1,4-glucanase o máximo foi de 50°C e pH 5,5. A β -1,3-glucanase apresentou atividade correspondente a uma meia vida de 10 e 1 minutos a 70°C e 80°C respectivamente.

O sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata*, crescido por dez dias em meio contendo quitina como fonte de carbono, apresentando atividade de β -1,3-glucanase, foi ultrafiltrado com uma membrana de exclusão de 30kDa, concentrado e submetido a uma cromatografia de troca iônica em resina S-Sepharose. Essa cromatografia resultou em um pico de proteínas com atividade de β -1,3-glucanase o qual foi em seguida, recromatografado em uma coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose). Um novo pico de proteínas com três espécies protéicas foi obtido, conforme mostrado em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. O rendimento deste processo de purificação parcial desta β -1,3-glucanase foi de 0,023%, e o fator de purificação de 345,3 vezes.

Abstract

The rubber tree (*Hevea* spp.) is a native plant from the amazonic region, from which the latex is extracted in order to make the natural rubber. Brazil once was the mundial leader in latex production, and it was the responsible for 40% of brazilian exportations. However, this plant is vulnerable to the attacks from the phytopathogen *Microcyclus ulei*, agent of the leaf blight of the rubber tree, and is also endemic from the amazonic region and the main responsible for the fall in production in latex in latin America, and loss of market shares for the asian countries of Sri Lanka and Malasia. Nonetheless, in this context, the mycopathogen fungus *Dicyma pulvinata* came forth, and shows high capacities in the biological control of *M. ulei*. Base don this, there is a new alternative for the biological control for the leaf blight of the rubber tree.

In this work the capacity of production of glicosyl hidrolases (β -1,3-, β -1,3-1,4- e β -1,4-glucanase e quitinase) of two isolates CEN62 e CEN93, which had demonstrated in anterior studies to be good antagonists of the phytopatogen *M. ulei*, were analyzed. Then, a project started to evaluate the capacity of production of these enzymes by these two isolates, and the characterization of their biochemical and molecular properties.

The two isolates have demonstrated capacity to product the enzymes β -1,3-, β -1,3-1,4-glucanase and quitinase. Nevertheless, just the isolate CEN62 demonstrated activity of β -glucanase in the medium filtrate. None of the isolates secreted quitinase activity. However, a significant activity of quitinase was found associated to the mycelium. It was not possible, however, to extract this activity nor by cell lysis using detergent, nor by lysing by sonication.

Then, the CEN62 medium filtrate was chosen for further purification steps, by showing β -1,3-glucanase activity.

The isolate CEN62 medium filtrate was then biochemically characterized, being possible to evaluate that the β -1,3-glucanase activity had a maximum at 60°C and pH 5,5, and the β 1,3-1,4-glucanase activity had its maximum at 50°C and pH 5,5. The β -1,3-glucanase activity showed a half-life period of ten and one minutes at 70°C e 80°C respectively.

The CEN62 medium filtrate of *D. pulvinata* after growing for ten days in medium containing chitin as carbon source, and containing β -1,3-glucanase activity was ultrafiltered with an exclusion membrane of 30kDa, and the concentrate was submitted to ion exchange chromatography in S-Sepharose resin. This chromatography resulted in a protein peak with β -1,3-glucanase activity, which was, thereafter, rechromatographed in an ion exchange column (DEAE-Sepharose), resulting in a new protein peak, with three protein species as shown in SDS-PAGE. The yield of this process of β -1,3-glucanase partial purification was of 0,023%, and purification factor of 345,3 times.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico da heveicultura no Brasil	1
1.2 A seringueira e suas principais enfermidades	4
1.2.1 <i>Microcyclus ulei</i>	5
1.2.2 Sintomatologia	7
1.2.3 Controle do patógeno <i>Microcyclus ulei</i>	7
1.3 Controle biológico	8
1.3.1 <i>Dicyma pulvinata</i> como agente de controle biológico do mal das folhas	10
1.3.2 As enzimas hidrolíticas	
1.3.2.1. β glucanases	12
1.3.2.2 Quitinases	13
1.4 A biotecnologia e o controle biológico	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Substratos utilizados	17
3.2 Meios de Cultura utilizados	19
3.3 Origem e manutenção das cepas de <i>Dicyma pulvinata</i>	20

3.4 Produção de Enzimas	20
3.5 Ensaio Enzimáticos	21
3.5.1 Ensaio de atividade de quitinase	21
3.5.2 Ensaio de atividade de β -1,3-glucanase	22
3.5.3 Ensaio de atividade de β -1,3-1,4-glucanase	23
3.5.4 Ensaio de atividade de β -1,4 glucanase (celulase)	23
3.5.5 Ensaio com o meio de cultura contendo PMSF	24
3.5.6 Ensaio de quitinase após dissolução da parede do micélio com detergente	24
3.6 Lise do micélio por ultra-som	25
3.7 Caracterização do meio de cultura	25
3.7.1 Ensaio de Temperatura ideal para β glucanase no meio de cultura	25
3.7.2 Efeito do pH na atividade beta-glucanase presente no meio de cultura do isolado CEN62 de <i>Dicyma pulvinata</i> crescido em meio contendo quitina como fonte de carbono	26
3.8 Purificação de uma β -1,3-glucanase do meio de cultura de CEN62	27
3.8.1 Concentração das amostras de β -1,3-glucanase	27
3.8.2 Teste de adsorção em resinas de troca iônica	27
3.8.3 Cromatografia de troca iônica em S- Sepharose	28
3.8.4 Cromatografia de troca iônica em DEAE- Sepharose	28
3.8.5 Caracterização eletroforética	29
3.9 Determinação da concentração de proteínas	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Produção de glicosil hidrolases por <i>Dicyma pulvinata</i>	31

4.1.1 Perfil de atividade enzimática no isolado CEN 93	31
4.1.2 Perfil de atividade enzimática no isolado CEN 62	34
4.2 Adição de PMSF no meio de cultura do isolado CEN62	37
4.3 Influência da adição de detergente no macerado do micélio de CEN 62	39
4.4 Lise do micélio por Ultra-som	40
4.5 Caracterização da β glucanase presente no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 de <i>Dicyma pulvinata</i> crescido em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono	41
4.5.1 Influência da temperatura	41
4.5.2 Influência do pH	42
4.5.3 Termoestabilidade	43
4.6 Purificação da β -1,3-glucanase produzida pelo isolado CEN62 de <i>Dicyma pulvinata</i> crescido em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono e secretada no sobrenadante do meio de cultura	44
4.6.1 Cromatografia de troca iônica (S-Sepharose)	47
4.6.2 Cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose)	51
4.6.3 Tabela de rendimento do processo de purificação	54
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	58
7. PERSPECTIVAS	60
8. BIBLIOGRAFIA	61

ABREVIATURAS

[]: Concentração
Abs.: Absorbância
BSA: Albumina sérica bovina
CMC: Carboximetil Celulose
DEAE-Sepharose: (Dietilamino)-Sepharose
DNS: Ácido Dinitrosalicílico
EC: Enzyme Commission
g: grama
kDa: Kilodaltons
min: minuto
mL: Mililitro
MM: Massa Molecular
 μ L: Microlitro
 μ g: Micrograma
 μ mol: Micromo
nm: Nanômetro
SDS: Dodecil sulfato de sódio
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH: Potencial Hidrogeniônico
PMSF: Phenilmethilsulphonyl Fluoride
p/v: peso volume
TCA: Ácido Tricloroacético
TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano
UI: Unidade internacional
UnB: Universidade de Brasília
v/v: Volume/volume
TEMED: N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da laminarina	17
Figura 2	Figura 2: Estrutura da β -D-glucana de cevada	17
Figura 3	Estrutura da quitina	18
Figura 4	Estrutura da carboximetilcelulose	18
Figura 5	Atividade enzimática presente no meio de cultura do isolado CEN93.	32
Figura 6	Atividade enzimática associada à fração solúvel do micélio do isolado CEN93.	32
Figura 7	Atividade enzimática associada à fração insolúvel do micélio do isolado CEN93.	33
Figura 8	Atividade enzimática presente no meio de cultura do isolado CEN62.	35
Figura 9	Atividade enzimática associada à fração solúvel do micélio do isolado CEN62.	35
Figura 10	Atividade enzimática associada à fração insolúvel do micélio do isolado CEN62.	36
Figura 11	Atividade enzimática quitinolítica associada à fração insolúvel do micélio do isolado CEN62.	36
Figura 12	Atividade de β -1,3-glucanase no meio de cultura do isolado CEN62 com e sem PMSF	37
Figura 13	Atividade de β -1,3-1,4-glucanase no meio de cultura do isolado CEN62 com ou sem PMSF.	38
Figura 14	Influência da temperatura na atividade β -1,3 e β -1,3-1,4-glucanase do meio de cultura de CEN62.	41
Figura 15	Influência do pH na atividade de β -1,3 e β -1,3-1,4-glucanase no meio de cultura de CEN62	42
Figura 16	Termoestabilidade da atividade de β -1,3-glucanase presente no meio de cultura de CEN62 .	43

Figura 17	Fluxograma das etapas de purificação da enzima β -1,3-glucanase produzida pelo isolado CEN62 .	45
Figura 18	Perfil eletroforético da amostra do concentrado em membrana de ultrafiltração de 30 KDa do sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 .	46
Figura 19	Perfil cromatográfico da amostra de β -1,3-glucanase em coluna de S-Sepharose	48
Figura 20	Perfil eletroforético da amostra dos eluatos de PS 1.	49
Figura 21	Perfil cromatográfico da amostra de β -1,3-glucanase em coluna de S-Sepharose, sendo aplicado 2mL por tubo.	50
Figura 22	Perfil eletroforético da amostra dos eluatos de PS 2.	50
Figura 23	Perfil cromatográfico da amostra de β -1,3- glucanase proveniente da fração 7 (PS 1) do eluato da coluna de S-Sepharose	52
Figura 24	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15%, corado com coomassie coloidal, da amostra dos eluatos de PD1 provenientes da fração 7 de PS 1	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Composição bioquímica da parede celular de diferentes Filos referentes ao Reino Fungi	10
Tabela 2	Tampões utilizados para ensaio de pH ideal do meio de cultura	26
Tabela 3	Influência do detergente Tween 80 na dissociação da atividade quitinolítica associada ao micélio do isolado CEN62 de <i>D. pulvinata</i> crescido por 7 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono.	39
Tabela 4	Atividade quitinolítica de diversas frações do micélio de CEN62 de <i>D. pulvinata</i> crescido por 7 dias em meio de cultura contendo quitina como fonte de carbono. As frações foram obtidas por maceração e sonicação.	40
Tabela 5	Etapas do processo de purificação da enzima β -1,3-glucanase de <i>D. pulvinata</i> crescido por dez dias em meio contendo quitina como fonte de carbono	54

1. Introdução

1.1 Histórico da heveicultura no Brasil

A seringueira (*Hevea* spp.) é uma planta nativa da Região Amazônica da qual se extrai o látex para fabricação de borracha natural. Pertence à família das Euphorbiaceas, sendo que a classificação atual do gênero *Hevea* apresenta onze espécies, dentre as quais se destaca *Hevea brasiliensis* M. Arg. , com maior capacidade produtiva de látex e variabilidade genética (Costa *et al.*, 2001). Tem como área de ocorrência e dispersão natural a Amazônia brasileira e países próximos, como Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana (Costa *et al.*, 2001).

A domesticação da seringueira ocorreu entre o final do século XIX e o início do século XX. O látex, produto obtido da seringueira, foi um dos grandes produtos de exportação e gerador de divisas para a nação. Não somente no Brasil, mas na região equatorial da América Latina, o cultivo da seringueira foi importante na busca do equilíbrio da balança comercial (Costa *et al.*, 2001).

No Brasil, no período conhecido como “República do café-com-leite” (1894-1919) a borracha chegou a ser o segundo maior produto de exportação brasileiro, perdendo apenas para o café. A produção brasileira chegou a ser, no período de 1901 a 1910, de 34.000 toneladas /ano, alcançando um recorde em 1912, de 42.000 toneladas, o que equivaleria a 40 % das exportações nacionais (Arruda & Pilletti, 1997).

A riqueza do período induziu uma explosão demográfica e econômica na região amazônica. A população sofreu forte crescimento entre 1890 e 1906, chegando a mais de um milhão de habitantes. O Brasil chegou a ocupar território boliviano na busca por terras produtoras de látex, resultando em um conflito armado. O conflito terminou em 1903 com o Tratado de Petrópolis, no qual o Brasil anexou a região correspondente ao atual estado do Acre (Arruda & Pilletti, 1997).

O declínio brasileiro como produtor de borracha começou no fim da década de 1910, causado por dois fatores. O primeiro foi a competição oferecida pelas colônias inglesas do Ceilão (atual Sri Lanka) e Cingapura, utilizando mudas de

seringueira contrabandeadas do Brasil. O segundo foi a queda da produção brasileira causada por diversas doenças endêmicas. Isso devido ao fato da região amazônica ser o centro de origem de seus principais parasitas (Bernardes *et al.*, 1990; Arruda & Pilletti, 1997).

Enquanto os plantios com base em clones subtraídos das matas brasileiras iam cada vez mais se expandindo no sudeste da Ásia, no Brasil o principal problema era o fungo *Microcyclus ulei*. Nos primeiros 20 anos do século XX, as plantações de seringueira das Guianas falharam, em decorrência do mal das folhas (Holliday, 1970).

No Brasil, plantios comerciais adensados foram implantados a partir de 1927, numa iniciativa da FORD Motor Company, no Estado do Pará (Trindade & Furtado, 1997). O controle de uma grande fonte de produção de borracha atendia aos interesses do empresariado estadunidense, que à época seguia os preceitos desta Doutrina Ford, a qual se baseava resumidamente no controle de todas as etapas do meio de produção. O governo estadunidense obteve então 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 (Arruda & Pilletti, 1997).

Em 1928, a Companhia estabeleceu os primeiros plantios na recém fundada cidade de Fordlândia. O material plantado foi obtido de sementes da região do rio Solimões e Machado, próximo a Belém. A tentativa foi frustrada, em razão da ocorrência freqüente do mal das folhas. Suspenso em 1933, começaram então os plantios em Belterra que também sofreram 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). Apesar da grande incidência de *M. ulei*, os 3.000 hectares plantados em Fordlândia não foram abandonados. Algumas plantas mostraram graus variáveis de resistência à doença.

Até a década de 1980, insistiu-se no cultivo da seringueira na região Nordeste, principalmente no estado da Bahia. Mas devido às condições climáticas, a produção foi inviável, devido ao favorecimento de seu principal patógeno, o fungo causador do mal das folhas (*M. ulei*) (Pereira & Pereira, 2001). Uma solução para este problema foi a introdução da cultura na região Centro-Oeste, onde o clima

apresentava-se prejudicial a esse fungo (Gasparotto *et al.*, 1990). Assim a heveicultura expandiu-se para os estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (Mello *et al.*, 2003).

A partir de 1982, a produção de borracha natural no Brasil apresentou outro incremento significativo, resultante das políticas adotadas de incentivo através da SUDHEVEA, com o Programa de Incentivo a Produção de Borracha Natural (PROBOR) e, também através da iniciativa privada nas regiões de escape, sobretudo nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (Dean, 1989).

Até 1988 foram plantados 166.000 hectares, sendo 119.000 com incentivos do governo. Deste total 95.000 hectares localizavam-se em áreas tradicionais de plantio (região amazônica), dos quais 38.000 hectares foram perdidos devido à doença (Trindade & Furtado, 1997).

As áreas de cultivo de seringueiras nas regiões Sudeste e Centro-Oeste correspondiam em 2000 a 100.000 hectares. Ainda assim, a produção brasileira não adquiriu o status de auto-suficiência. Neste mesmo ano, o Brasil produziu 88.000 toneladas de borracha natural, enquanto o consumo foi de 235.000 toneladas, ou seja, o Brasil produziu 37 % de suas necessidades. Entre 1970 e 1996 a produção brasileira cresceu 114 %, enquanto o consumo cresceu 310 % (Pereira & Pereira, 2001).

De acordo com dados elaborados pelo Ministério de Agricultura e Abastecimento (MAA), a produção de borracha natural no Brasil aumentou cerca de três vezes entre os anos de 1990-1997, tendo se destacado como maior produtor nacional o estado de São Paulo com 57 % da produção total em 1997. Isso se deu devido ao fato de o planalto paulista ser considerado a principal área de escape do mal das folhas (Tavares, 2001).

Atualmente, o consumo da borracha natural é menor que o da borracha sintética. A borracha natural, entretanto, em função de suas características de elasticidade, plasticidade, resistência à fricção e impermeabilidade para líquidos,

sempre será de grande importância para a indústria, uma vez que é insubstituível para a produção de subprodutos, como pneus de aviões e luvas cirúrgicas (Goncalves *et al.*, 1990).

1.2 A seringueira e suas principais enfermidades

As enfermidades da seringueira podem ser causadas por diferentes patógenos. Dentre os quais podemos destacar os fungos do gênero *Phytophthora*, causadores do cancro (*P. capsici* Leonian), a requeima (*P. palmivora* Butler) e a queda anormal das folhas (*P. citrophthora* Leonian); os causadores da antracnose (*Glomerella cingulata*); da mancha areolada (*Thanaphorus cucumeris*); do mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*); do Oídio (*Oidium heveae* Stenn); a Podridão de Raízes, causada pelos fungos *Ganoderma philipii*, *Rigidoporus lignosus* e *Phellinus noxius*; o complexo Crosta Negra (*Phyllachora huperi*); a mancha de *Cercospora* (*Cercospora heveae* Vincens); a Mancha da *Alternaria* (*Alternaria* sp.); a Mancha concêntrica (*Periconia manihoticola*); a Mancha de *Corynespora* (*Corynespora cassiicola*); a Rubelose (*Phanerochaete salmonicolor*); a Podridão do Enxerto e Casca (*Lasiodiplodia theobromae*); e por fim o fungo causador do mal das folhas, *M. ulei* (Trindade & Furtado, 1997).

Este último é o causador da mais grave enfermidade da seringueira. Sua ocorrência ainda está restrita ao continente americano, abrangendo de El Palmar, no México, ao município de Jacupiranga, no Estado de São Paulo (Trindade & Furtado, 1997). O fungo ataca os folíolos jovens, causando perda das folhas e podendo acarretar em morte da planta (Gasparotto *et al.*, 1990).

1.2.1 *M. ulei*

Este fungo pertence à classe Loculoascomycetes e subdivisão Ascomycotina. No seu processo de desenvolvimento o patógeno *M. ulei* apresenta duas fases distintas. A fase conidial é denominada *Fusicladium macrosporum* Kuyper e a picnidial *Aposphaeria ulei*. Este fungo só foi encontrado parasitando e causando danos em espécies do gênero *Hevea*, principalmente, *H. guianensis*, *H. spruceana*, *H. Camargoana*, *H. camporum*, *H. brasiliensis* e *H. benthamiana* (Trindade & Furtado, 1997).

Durante o desenvolvimento da seringueira, na fase dos quatro ou cinco anos de idade, estas são decíduas, trocando de folha anualmente. Os folíolos senescentes apresentam no interior dos estromas os pseudotécios que abrigam os ascósporos do patógeno. Estes por sua vez acabam por infectar os folíolos novos (Gasparotto *et al.*, 1990).

Sob condições favoráveis à doença, cerca de cinco a seis dias depois, as lesões ficam cobertas de conídios, especialmente nas superfícies abaxiais dos folíolos. Estes conídios são disseminados pelo vento ou chuva e infectam outros folíolos novos. Os folíolos suscetíveis com até cerca de doze dias de idade e apresentando numerosas lesões no limbo, caem precocemente (Holliday, 1970; Chee, 1976b; c; Gasparotto *et al.*, 1990).

Uma vez no chão o fungo dos folíolos caídos continua esporulando e aumentando a produção de novos conídios. Com auxílio de ventos, os conídios produzidos nos folíolos caídos no chão ou presos às plantas são disseminados para outros folíolos de outras árvores mais distantes. As infecções por conídios, que induzem a queda de folíolos novos e a disseminação do patógeno, com conseqüentes infecções conidiais recicladas ou policíclicas acarretando mais desfolha e aumento da quantidade de inoculo, resultam no que se chama fase explosiva da doença (Holliday, 1970; Gasparotto *et al.*, 1990).

Os folíolos com mais de 12 dias de idade, infectados por ascósporos ou conídios, não sofrem queda prematura pela doença e permanecem na planta. Nestes folíolos, cerca de trinta a sessenta dias mais tarde, são observados estromas negros que abrigam a fase picnidial do patógeno (Holliday, 1970; Gasparotto *et al.*, 1990). Segundo Holliday (1970), os picnidiósporos germinam, mas não causam infecções.

Nos folíolos maduros, os sintomas de lixa quando investigados, revelam algumas cavidades estromáticas com picnidiósporos, outras contendo ascos e ascósporos e outras vazias, onde, presumivelmente, já houve liberação dos esporos. Estes folíolos caem na época do desfolhamento natural das árvores, tendo, portanto, as cavidades estromáticas que protegem os ascósporos e que são os responsáveis pela sobrevivência dos patógenos (Holliday, 1970; Chee, 1976a; Gasparotto *et al.*, 1990).

A temperatura ótima para germinação dos esporos, infecção e esporulação do patógeno está em torno de 24 °C (Holliday, 1970; Chee, 1976b). Foi constatado que isolados ou cepas do patógeno comportam-se diferentemente em relação à temperatura. A 16 °C alguns isolados esporulam e apresentam o período de incubação menor, enquanto outros não esporulam mesmo a 20 °C (Gasparotto, 1989).

Os conídios de *M. ulei* são disseminados pela água da chuva e ventos, sendo este último o maior responsável pela disseminação. Tem-se verificado que os conídios são disseminados em maior quantidade entre nove e quatorze horas, quando a temperatura é mais elevada e a umidade é mais baixa. Os ascósporos são ejetados quando os folíolos são molhados e submetidos a temperaturas mais baixas (Holliday, 1969; Chee, 1976b; Gasparotto *et al.*, 1990).

1.2.2 Sintomatologia

Os sintomas do mal das folhas podem ser observados no limbo, no pecíolo e nos ramos novos. Em plantas mais suscetíveis podem ser vistos em frutos verdes. A expressão dos sintomas do mal das folhas é dependente da idade dos folíolos e de sua suscetibilidade. Em folíolos jovens e suscetíveis observam-se lesões levemente escurecidas que provocam a deformação do limbo. Na superfície inferior dos folíolos, estas lesões apresentam tonalidade verde-oliva resultante da esporulação conidial da fase assexuada do patógeno (Gasparotto *et al.*, 1990).

Em condições de clima favorável à doença, infecções e re-infecções do patógeno podem causar desfolhamentos sucessivos geralmente ocasionando a morte da planta. Os folíolos que sofreram poucas infecções não caem prematuramente e quando maduros apresentam o sintoma de lixa, resultante da produção de estromas negros. Posteriormente os conjuntos estromáticos se desenvolvem, circundam as áreas lesionadas, cujas porções centrais se desprendem do limbo (Gasparotto *et al.*, 1990).

1.2.3 Controle do patógeno *M. ulei*

Como descrito anteriormente, uma das principais medidas de controle envolve o plantio em locais desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Entretanto o controle químico ainda é muito utilizado em viveiros, jardins clonais e plantios novos. Mas este tipo de controle é economicamente inviável em plantas adultas devido à altura das mesmas, e também devido aos problemas ambientais que os fungicidas causam (Trindade & Furtado, 1997).

Outra forma de controle consiste no emprego de clones resistentes. As primeiras seleções para resistência foram realizadas pela Companhia Ford na cidade de Fordlândia. Durante os anos de 1942 e 1945 o programa se expandiu, sendo

conduzido em cooperação com o recém criado Instituto Agrônômico do Norte (IAN) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Gonçalves, 1995).

Uma medida potencial de controle é o controle biológico do patógeno empregando-se o fungo hiperparasita *Dicyma pulvinata*. Este reduz o inoculo primário, uma vez que parasita a fase estromática de *M. ulei*, inviabilizando a produção e disseminação de ascósporos (Trindade & Furtado, 1997).

1.3 Controle biológico

Controle biológico pode ser definido como: “*a redução da densidade de inoculo ou das atividades determinantes da doença, esta provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou através de manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas*” (Baker e Cook 1974). Ou seja, é a redução da soma de inoculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, ou realizada através de um ou mais organismos que não o homem (Filho & Kimati, 1995).

Microrganismos parasitas de plantas constituem uma pequena fração dos habitantes das proximidades e da superfície dos órgãos das plantas (Filho & Kimati, 1995).

O uso de fungos como agente de controle biológico de fungos patogênicos surgiu com a descoberta de *Trichoderma lignorum* parasitando fungos fitopatogênicos. A partir desta descoberta, em 1932, as pesquisas sobre a utilização de micoparasitas no biocontrole avançaram enormemente (Adams, 1990). Este antagonismo entre fungos pode se dar tanto pela produção de enzimas com capacidades hidrolíticas, pela secreção de metabólitos antibióticos, como também por competição (Belanger *et al.*, 1995).

Vários fungos, entre eles *D. pulvinata*, são considerados micopatógenos potenciais para programas de controle biotecnológico.

1.3.1 *D. pulvinata* como agente de controle biológico do mal das folhas.

Em 1986, foi relatado pela primeira vez *D. pulvinata* colonizando lesões de *M. ulei* no Brasil. Os estromas negros deste patógeno, na fase da doença em que os sintomas caracterizam-se como lesões com aspecto de lixa, apresentam-se recobertas por estruturas branco-acinzentadas, que se mostravam extremamente esporulantes quando examinadas ao microscópio de luz (Tavares, 2001).

A partir do momento em que se constata a colonização por *D. pulvinata*, as estruturas de *M. ulei* rapidamente desaparecem, deixando cicatrizes epidérmicas no limbo foliar. A colonização na fase conidial de *M. ulei* foi constatada em estudos sob condições controladas. Os conídios de *D. pulvinata* germinam, crescendo os tubos germinativos em direção aos conídios do patógeno que são penetrados e destruídos pelo micoparasita (Tavares, 2001).

D. pulvinata foi encontrado parasitando vários fungos fitopatogênicos como *Cladosporium fulvum* Cooke, causador do mofo foliar do tomate. Ele age por meio da emissão de apressórios que recobrem e acabam matando seu hospedeiro (Peresse, 1980). Também foi sugerido como importante agente de controle biológico para mancha-foliar-tardia do amendoim, causada pelo fitopatógeno *Cercosporidium personatum* Earle (Taber *et al.*, 1981). Os conídios de *C. personatum* que escapam ao parasitismo por *D. pulvinata* são presos ao micélio do micoparasita, não se dispersando para iniciar novas infecções (Mitchell *et al.*, 1987). *D. pulvinata* também foi descrito colonizando lesões causadas por *Cercospora leucaenae* Saccardo, um fungo patogênico de *Leucaena leucocephala* (Shivas *et al.*, 1996).

A secreção de substâncias antibióticas por micoparasitas é amplamente relatada na literatura. Em culturas de *D. pulvinata* foi isolado um metabólito com função fungistática (“Deoxyphomenona”) nas regiões apicais de contato com *C. fulvum*, ocasionando no hospedeiro uma disfunção celular e conseqüente inibição no crescimento (Tirilly *et al.*, 1991).

1.3.2 As enzimas hidrolíticas

Analisando a estrutura das hifas miceliais é possível observar a presença de uma parede celular externa à membrana plasmática. Essa parede é constituída de duas porções, denominadas fibrilar e amorfa, e que são quimicamente diferentes à medida que se consideram os diferentes Filos do Reino Fungi (tabela 1) (Loguercio-Leite; & Esposito, 2004).

Tabela1: Composição bioquímica da parede celular de diferentes Filos referentes ao Reino Fungi

Filo	Componentes fibrilares	Componentes matriciais
Chytridiomycota	Quitina, quitosana	β glucanas
Zygomycota	Quitina, quitosana	Ácido poligalacturônico, proteína glucuronomano
Ascomycota	Quitina, β -1,3- e β -1,6-glucanas	α -1,3-glucana, proteína galactomano
Basidiomycota	Quitina, β -1,3- e β -1,6-glucanas	α -1,3-glucana, proteína xilomano

Fonte: adaptado de Loguercio-Leite & Espósito (2004)

A quitina é formada pelo homopolímero de N-acetil-glicosamina com ligações β 1,4. O mesmo polímero quando encontrado na sua forma não acetilada é definido como quitosana (Loguercio-Leite & Esposito, 2004). O polissacarídeo β -1,3-glucana é o componente mais abundante da parede celular de fungos, e a sua hidrólise enfraquece essa parede, podendo resultar na morte celular (Hong & Meng,

2003), sendo também encontradas na forma de polissacarídeo de reserva (laminarina) da alga *Laminaria digitata*. (Hong *et al.*, 2002).

Há duas hipóteses que explicam atualmente a forma como se dá o crescimento das hifas. A primeira explica que esse crescimento se dá por um balanço entre a lise da parede e síntese de novos polímeros de parede. Isso ocorre devido à rigidez da mesma, que impediria o crescimento do micélio (Loguercio-Leite & Esposito, 2004).

Outra hipótese diz que o ápice hifal é inerentemente viscoso, elástico e expansível, e a parede nova sintetizada neste ápice consiste de uma mistura de quitina não-cristalizada e β glucana. A rigidez da parede seria resultado da ligação desses polímeros à mesma (Wessels, 1993).

Durante o crescimento apical de fungos filamentosos, quitina e fibras de β -1,3-glucanas são sintetizadas simultaneamente no ápice das hifas em crescimento, que ficam, desta forma, expostas a hidrólise (Ordentlich *et al.*, 1988; Wessels, 1988).

Diferentes proteínas podem ter ação direta ou indireta no mecanismo de controle de pragas e doenças. Entre estas se incluem as proteínas da parede celular, as enzimas envolvidas no metabolismo de flavonóides e fenilpropanóides, as proteínas tóxicas tais como: os inibidores de enzimas hidrolíticas, as proteínas com propriedades antimicrobianas, as enzimas líticas e um grupo heterogêneo de proteínas conhecidas coletivamente como proteínas-PR (proteínas relacionadas à patogênese). (Cordero *et al.*, 1994). A este último grupo de proteínas incluem-se enzimas como as quitinases e β -1,3-glucanases (Leah *et al.*, 1991), que teriam ação decisiva na hidrólise da parede celular de outros fungos (Lima *et al.*, 1997).

1.3.2.1. β glucanases

As β -1,3-glucanases já foram descritas na literatura como capazes de degradar a estrutura micelial de fungos, apresentando assim caráter antifúngico. As β -1,3-glucanases são também amplamente citadas como elemento chave no antagonismo entre fungos. Isso nos permite atribuir-lhe um enorme potencial para o controle biológico (Hong & Meng, 2003).

Em geral, os micoparasitas possuem várias isoformas da enzima β -1,3-glucanase, de maneira que cada isoforma pode ocorrer em situações diferentes, dependendo da fonte de carbono utilizada no crescimento (Tweddell *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 2000).

A produção de β -1,3-glucanases pelo micoparasita *Trichoderma harzianum* é induzida na presença de parede celular purificada dos fungos *Pythium sp.*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, assim como de quitina, N-acetilglicosamina e laminarina (Noronha *et al.*, 2000), corroborando a potencial ação da enzima no micoparasitismo. A presença de glicose, o produto da quebra de β -1,3-glucana, mostrou-se inibitória à essa reação (Vazquez-Garciduenas *et al.*, 1998; Noronha *et al.*, 2000).

Uma β -1,3-glucanase da bactéria *Paenibacillus sp.*, obtida a partir do solo, purificada apresentou excelente atividade antifúngica contra o fungo fitopatogênico *Pythium aphanidermatum*, assim uma β -1,3-glucanase purificada de *Streptomyces sioyaensis* (Hong & Meng, 2003).

As β -1,3-glucanases são classificadas de acordo com o seu modo de ação. As exo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.58), libera resíduos de glicose das extremidades não-redutoras do polímero de glucana. As endo β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39) são capazes de clivar, aleatoriamente, ligações β -1,3 internas do polissacarídeo, liberando, assim, pequenos oligossacarídeos (Kulminskaya *et al.*, 2001). As endo- β -1,3-glucanases são também capazes de hidrolisar ligações do tipo β -1,4 e β -1,3-1,4, como a encontrada em glucana de cevada.

As β -1,3-glucanases de plantas e bactérias, embora sejam ambas capazes de hidrolisar β -1,3-glucana, são classificadas de formas diferentes. As enzimas de plantas são classificadas como da família das glicosil hidrolases 17, enquanto as de microorganismos como da família das glicosil hidrolases 16 (Henrissat, 1991).

As β -1,6-glucanases (EC 3.2.1.75) também estão envolvidas na degradação da parede celular de fungos e o micoparasitismo. Em *Trichoderma harzianum* a produção desta enzima foi induzida pela presença de quitina (De La Cruz & Llobell, 1999), ou com parede celular de fungos como fonte de carbono no meio indutor, o que corrobora a hipótese da ação desta enzima no micoparasitismo (Montero *et al.*, 2005).

1.3.2.2 Quitinases

As quitinases (EC 3.2.1.14), proteínas comumente produzidas como defesa pelos vegetais ou por micoparasitas, altamente específicas envolvidas nos mecanismos de resistência de plantas ou controle biológico contra patógenos, são enzimas que hidrolisam quitina (Bowles, 1990). Já foi mostrado que diversas espécies vegetais, inclusive a própria *Hevea brasiliensis*, produzem quitinases para proteção contra patógenos (Rozeboom *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 2000).

As quitinases têm sido estudadas e seu substrato não é encontrado em plantas (Collinge *et al.*, 1993; Graham & Sticklen, 1994), nem na maioria dos procariotos (Gooday, 1990). Portanto essa enzima apresenta um grande potencial no controle biológico de fungos, uma vez que a quitina é comumente um componente estrutural de importantes patógenos e pragas de plantas (Collinge *et al.*, 1993).

Já foi demonstrado que, na presença de parede celular purificada dos fungos fitopatogênicos *Sclerotium rolfii* e *Rhizoctonia solani*, há indução na produção de quitinases pelo fungo micoparásita *Trichoderma* sp. (Lima *et al.*, 1999). Foi demonstrado também que *Trichoderma harzianum*, capaz de parasitar o fitopatógeno *Crinipellis pernicioso*, causador da vassoura de bruxa do cacau (Bastos,

1996), produz uma quitinase quando crescido em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono. Foi observado que essa quitinase era capaz de afetar drasticamente a parede celular de *C. perniciosus* em ensaios *in vitro* (De Marco *et al.*, 2000).

Embora o gene de quitinases esteja presente numa grande quantidade de organismos, os fungos e bactérias filamentosos foram descritos com mais capacidade de degradar quitina do que outros microorganismos não-filamentosos. Já foi mostrado que bactérias do solo, com capacidades quitinolíticas, são mais eficientes no antagonismo a fungos do que outras bactérias, uma vez que interferem no crescimento das hifas. Entretanto, a ação da quitinase isolada não inibia esse crescimento, e os níveis de produção de quitinase de diferentes bactérias não estão relacionados às suas capacidades como fungicida (De Boer *et al.*, 1998).

Em certos fungos a estrutura de quitina, mesmo no ápice das hifas, pode ser protegida por uma série de proteínas, conferindo ao fungo resistência a quitinases (Sivan & Chet, 1989). Há também fungos que não podem ser inibidos por quitinases isoladamente (Mauch *et al.*, 1988), mostrando que o efeito de quitinases pode depender da ação sinérgica de β -1,3-glucanases ou outras substâncias antifúngicas (Mitchell & Alexander, 1961; Collinge *et al.*, 1993; Vad *et al.*, 1993). Assim, o uso de quitinases e β -1,3-glucanases associadas é bastante interessante no controle biológico de fungos.

1.4 A biotecnologia e o controle biológico

Apesar de microrganismos antagônicos servirem como controle de fitopatógenos, diversos efeitos podem ser observados, após a sua aplicação, sobre outros organismos presentes no ambiente. Assim, há necessidade de estudos no sentido de avaliar os possíveis impactos causados pela utilização de agentes de controle biológico sobre o ambiente. Tal como acontece com os pesticidas em seus aspectos toxicológicos antagonistas exercidos sobre os animais, incluindo o homem.

O controle biológico, ao contrário do químico, não apresenta efeito imediato e espetacular. O nível de controle obtido com o método biológico, isoladamente, pode estar abaixo do necessário para que danos à produção não ocorram. Assim, há necessidade de integração dos métodos de modo a haver mínima interferência entre os métodos aplicados. Ou seja, cada medida de controle deve conter um efeito aditivo e sinérgico para atuarem juntos em uma conjuntura de equilíbrio ecológico onde as chances de sucesso são maiores.

Nesse contexto, esse trabalho surge com o intuito de elucidar alguns dos mecanismos bioquímicos de controle biológicos utilizados pelo fungo *D. pulvinata* no parasitismo de *Microcyclus ulei*.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Tendo em mente a ação conjunta das quitinases com as β -1,3-glucanases no controle biológico de fungos, este trabalho teve por objetivo averiguar a produção destas enzimas por *D. pulvinata* de isolados CEN 62 e CEN 93. E a partir de então a purificação da enzima β -1,3-glucanas do meio de cultura de *D. pulvinata* isolado CEN62 para aplicação no controle biológico do fungo fitopatogênico *M. ulei*.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar a capacidade de hidrólise de laminarina (β -1,3-glucana), glucana de cevada (β -1,3-1,4-glucana) e celulose (β -1,4-glucana) pelo fungo *D. pulvinata*, isolados CEN62 e CEN93.
2. Caracterizar a atividade de β glucanase presente no extrato bruto do meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata*; quanto à temperatura e pH ótimos e termoestabilidade.
3. Purificar uma β -1,3-glucanase presente no meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata*, crescendo em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono.

3. Material e métodos

3.1 Substratos utilizados

3.1.1 Laminarina - Sigma Chemical Company – Polímero de D-glicose com ligações β -1,3.

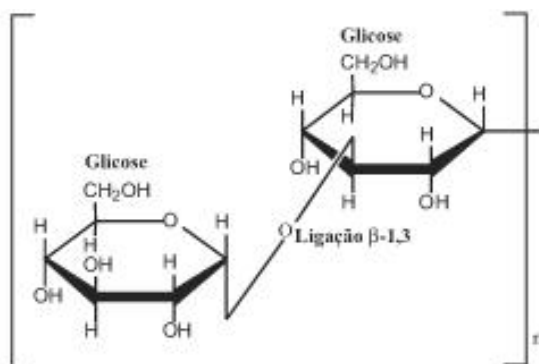


Figura1: Estrutura da laminarina.

3.1.2 β -D-Glucana de cevada - Sigma Chemical Company - Polímero de D-glicose com ligações β -1,3 e β -1,4.

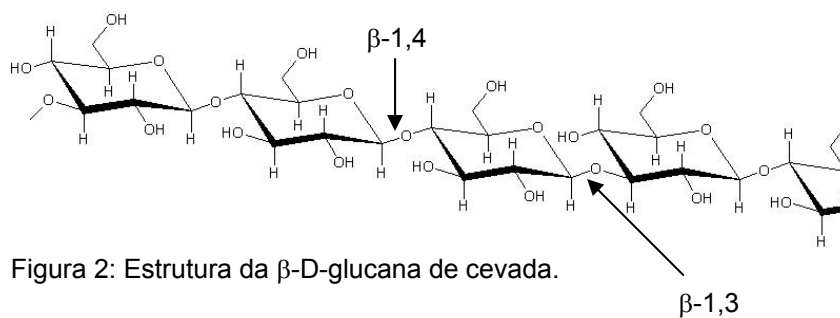


Figura 2: Estrutura da β -D-glucana de cevada.

3-1.3 Quitina - Sigma Chemical Company – Polímero de N-acetil-glicosamina com ligações β -1,4.

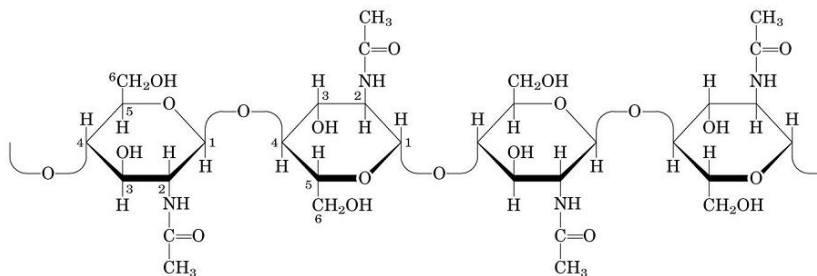


Figura 3: Estrutura da quitina.

3.1.4 Carboximetilcelulose (CMC) - Sigma Chemical Company - Polímero de D-glicose com ligações β 1,4

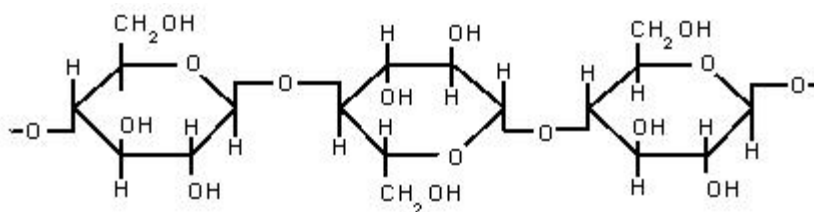


Figura 4: Estrutura da carboximetilcelulose.

3.2 Meios de Cultura utilizados

MYG

Extrato de Malte	0,5% (p/ v)
Extrato de Levedura	0,25% (p/ v)
Glicose	1,0% (p/ v)
Ágar	2,0% (p/ v)

Ajustar pH 6,2

Meio Sintético

MgSO ₄	2,0 (g/ L)
K ₂ HPO ₄	0,6 (g/ L)
KCl	0,15 (g/ L)
NH ₄ NO ₃	1,0 (g/ L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 (mg/ L)
MnSO ₄ .H ₂ O	6,0 (mg/ L)
ZnSO ₄ .H ₂ O	4,0 (mg/ L)
CaCl ₂	2,0 (mg/L)
Glicose	0,025% (p/v)

Ajustar pH 5,5

Quitina	1,0% (p/v)
---------	------------

3.3 Origem e manutenção das cepas de *D. pulvinata*

Foram utilizadas neste trabalho dois isolados, CEN 93 (CG 774) e CEN 62 (CG 683), de *D. pulvinata* cedidos pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As repicagens de *D. pulvinata* foram realizadas em meio de batata-dextrose-ágar (BDA). A incubação se deu a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas (Mello *et al.*, 2003).

Os isolados são mantidos em placas de Petri contendo meio MYG. O meio MYG foi selecionado devido a sua capacidade de produzir grande quantidade de esporos e de massa micelial (Queiroz *et al.*, 2002). Cada nova placa inoculada foi incubada por uma semana a 28 °C. Após esse período as placas contendo colônias foram guardadas sob refrigeração, a 4°C, para utilização.

3.4 Produção de Enzimas

A partir das cepas crescidas em placa contendo meio MYG, foi feito o inóculo em meio sintético, com a finalidade de induzir a produção das enzimas quitinase e β -glucanase, de interesse para esse estudo.

Foram adicionados às placas contendo as cepas isoladas 20 mL de solução salina 0,9% e 300 μ L da solução de tween 80 0,1%. Os esporos foram então ressuspensos utilizando uma haste estéril. Essa suspensão de esporos foi inoculada em um erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio sintético. O volume de suspensão inoculada foi de 5 mL para o CEN62, e 10 mL para o CEN93. Os frascos são então incubados a 28 °C e a 120 rpm.

O isolado CEN62 foi cultivado nos tempos 0, 96, 120, 144, 168, 240, 384 horas (4, 5, 6, 7, 10 e 16 dias), enquanto o CEN93 foi cultivado por 240, 264, 288, 316 e 408 horas (10, 11, 12, 13, e 17 dias). Após o tempo de cultivo o sobrenadante

de cultura foi separado da massa micelial por filtração com papel de filtro. Tanto o sobrenadante como a massa micelial foram congelados para a realização de ensaios enzimáticos.

3.5 Ensaios Enzimáticos

Para a realização dos ensaios enzimáticos foram utilizados como possíveis fontes da enzima o sobrenadante da cultura e a massa micelial. A massa micelial, de peso úmido 10,71g, foi separada em suas frações insolúvel e solúvel obtidas por maceração em um cadinho de porcelana de micélio congelado em nitrogênio líquido. Tanto as frações solúvel e insolúvel da massa micelial foram utilizadas como fontes de enzima. Após a massa micelial ser macerada foram adicionados 20 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5, e a fração solúvel foi obtida por centrifugação a 6000 rpm por 20 minutos a 4°C.

3.5.1 Ensaio de atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi determinada pela quantificação de açúcar redutor (método do DNS) (Miller, 1959) liberado da quitina regenerada. O sistema de ensaio constitui-se de 200 µL de extrato bruto (que pode ser o sobrenadante de cultura ou as frações solúvel e insolúvel da massa micelial) e 200 µL de quitina regenerada (0,5%) dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 (Molano *et al.*, 1977). O ensaio foi conduzido por 12 horas a 37 °C. Em seguida foi retirada uma alíquota de 200 µL do sistema de reação, e a ela acrescentado 800 µL do reagente DNS. O sistema foi fervido por 5 minutos e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A atividade enzimática foi mensurada em UI (unidade internacional), correspondendo a 1 µmol de açúcar redutor produzido por minuto.

Como controle da reação foi realizado um sistema idêntico, porém com a amostra do extrato bruto fervida por 5 minutos antes de ser adicionada a solução de quitina.

A quitina regenerada foi preparada pela acetilação de quitosana conforme descrito por Molano *et al.* 1977. Um grama de quitosana dissolvido em 100mL de ácido acético 10 % (v/v) foi macerado em um cadinho de porcelana e incubado por 17 horas a temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados, lentamente, 30 mL de metanol e a solução obtida foi filtrada em gaze. Ao filtrado foi adicionado anidrido acético, sob agitação lenta, até que 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 etanol e, posteriormente, centrifugada a 12000 g por 15 minutos a 4° C. O sedimento foi lavado exaustivamente com água destilada até a sua neutralização (pH 7), liofilizado e estocado a -20°C.

3.5.2 Ensaio de atividade de β -1,3-glucanase

A atividade β -1,3-glucanase foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor liberado de laminarina. Em 100 μ L de solução de laminarina 1% diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 , foram adicionados 100 μ l de extrato bruto. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. A ela foi então acrescentado 800 μ L do reagente DNS. O sistema foi fervido por 5 minutos e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A atividade enzimática foi mensurada em UI (unidade internacional), correspondendo a 1 μ mol de açúcar redutor produzido por minuto.

Como controle da reação foi realizado um sistema idêntico, porém com a amostra do extrato bruto fervida por 5 minutos antes de ser adicionada a solução de laminarina.

3.5.3 Ensaio de atividade de β -1,3 e β -1,4 glucanase

As atividades β -1,3- e β -1,4-glucanase foram determinadas medindo-se a quantidade de açúcares redutores liberados de glucana. Em 100 μ L de solução de glucana 1% diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 , foram adicionados 100 μ L de extrato bruto. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. A ela foi então acrescentado 800 μ L do reagente DNS. O sistema foi fervido por 5 minutos e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A atividade enzimática foi mensurada em UI (unidade internacional), correspondendo a 1 μ mol de açúcar redutor produzido por minuto.

Como controle da reação foi realizado um sistema idêntico, porém com a amostra do extrato bruto fervida por 5 minutos antes de ser adicionada a solução de glucana.

3.5.4 Ensaio de atividade de β -1,4 glucanase (celulase)

A atividade β 1,4 glucanase foi determinada medindo-se a quantidade de açúcares redutores liberados de CMC. Em 100 μ L de solução de CMC 1% diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 , foram adicionados 100 μ L de extrato bruto. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. A ela foi então acrescentado 800 μ L do reagente DNS. O sistema foi fervido por 5 minutos e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A atividade enzimática foi mensurada em UI (unidade internacional), correspondendo a 1 μ mol de açúcar redutor produzido por minuto.

Como controle da reação foi realizado um sistema idêntico, porém com a amostra do extrato bruto fervida por 5 minutos antes de ser adicionada a solução de CMC.

3.5.5 Ensaio com o meio de cultura contendo PMSF

O crescimento do isolado CEN62 em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono foi realizado conforme a seção 3.4, sendo que ao meio de cultura foi adicionado o inibidor de proteases Phenilmethylsulphonyl Fluoride (PMSF). Com essa finalidade foi preparada uma solução de estoque de PMSF de 10 mM de PMSF. Essa solução estoque foi preparada em etanol 100%, devido à insolubilidade do PMSF em água.

Após a filtração, o meio de cultura foi dividido em duas alíquotas iguais, de 100 mL cada. Uma delas foi deixada inalterada, enquanto a outra recebeu 1 mL da solução de estoque de PMSF para uma concentração final de 0,1 mM. Desta forma os ensaios de β glucanase e quitinase foram realizados, conforme a seção 3.5, tanto com o meio inalterado como com o meio de cultura contendo PMSF.

3.5.6 Ensaio de quitinase após dissolução da parede do micélio com detergente

O ensaio foi realizado com o micélio, após maceração com nitrogênio líquido. O micélio foi então ressuspense com 20 mL de tampão Acetato de sódio pH 5,0 0,1 M e centrifugado a 4500 g por 20 minutos a 4°C, sendo separado o sobrenadante do precipitado. O precipitado foi então ressuspense em uma solução de 20 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 contendo Tween 80. Foram utilizadas várias proporções de Tween 80 como a seguir.

Foi preparada uma solução de estoque de Tween 80 0,1 %. Foram então criados seis modelos de ressuspensão contendo 10 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L e 1 mL, completando o volume para 20 mL com tampão Acetato de sódio pH 5,0 0,1 M. O precipitado obtido pela centrifugação foi então ressuspense em uma das soluções de tampão com Tween 80, vortexado por 30 segundos, e deixado para incubar à temperatura ambiente por 5 minutos. Essa suspensão foi então

centrifugada a 4500 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de quitinase. O ensaio foi realizado como descrito anteriormente, na seção 3.5.2, utilizando-se o sobrenadante da primeira (sem Tween) e das segundas centrifugações (com Tween) como extrato bruto. Como controle foi realizado o ensaio também com o sobrenadante da primeira centrifugação. O branco de cada uma dessas reações foi obtido realizando o mesmo ensaio com o respectivo sobrenadante fervido por 5 minutos.

3.6 Lise do micélio por ultra-som

Após a maceração em um cadinho de porcelana com nitrogênio líquido, o micélio ressuspense em igual volume de tampão foi submetido ao aparelho de ultra-som. O aparelho utilizado foi o de fabricação da empresa General Electric Biosystems e modelo 50T. O micélio ressuspense foi exposto ao ultra-som por três seções de 30 segundos, com intervalos de um minuto e meio cada. A amostra foi mantida no gelo durante todo o processo. Foi utilizada a potência de 100% do aparelho.

3.7 Caracterização enzimática do meio de cultura

3.7.1 Ensaio de Temperatura ideal para β glucanase no meio de cultura

Foi realizado um ensaio para detectar a temperatura ideal do meio de cultura para atividade β glucanase. Foi utilizada uma amplitude de temperatura entre 25°C e 85°C.

As atividades β -1,3- e β -1,4- glucanase foram determinadas medindo-se a quantidade de açúcares redutores liberados de glucana ou laminarina. Para tanto foram realizados dois ensaios para cada temperatura, um com glucana e outro com laminarina. Em 100 μ L de solução de glucana 1% ou laminarina 1% diluídas em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5, foram adicionados 100 μ L de extrato bruto. A mistura foi incubada a diferentes temperaturas por 30 minutos. A ela foi então

acrescentado 800 µL do reagente DNS. O sistema foi fervido por 5 minutos e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A atividade enzimática foi mensurada em UI (unidade internacional), correspondendo a 1 µmol de açúcar redutor produzido por minuto. O controle da reação foi feito utilizando-se o mesmo extrato bruto fervido por 10 minutos.

3.7.1 Efeito do pH na atividade beta-glucanase presente no meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido em meio contendo quitina como fonte de carbono

Foi realizado um ensaio para detectar o pH ideal do meio de cultura para β glucanases. Foi utilizada uma amplitude de pH entre 3 e 9. Foram utilizados os seguintes tampões para atingir os pH desejados.

Tabela 2: Tampões utilizados para ensaio de pH ideal do meio de cultura

pH	Tampão
3	acetato de Sódio 0,5 M
3,5	acetato de Sódio 0,5 M
4	acetato de Sódio 0,5 M
4,5	acetato de Sódio 0,5 M
5	acetato de Sódio 0,5 M
5,5	acetato de Sódio 0,5 M
6	fosfato de Sódio 0,5 M
6,5	fosfato de Sódio 0,5 M
7	Tris HCl 0,5M
7,5	hepes 0,5M
8	hepes 0,5M
9	Tris HCl 0,5M

As atividades β-1,3 e β-1,4-glucanase foram determinadas medindo-se a quantidade de açúcares redutores liberados de glucana ou laminarina Para tanto, foram realizados dois ensaios para cada pH, um com glucana e outro com laminarina. Em 50 µL de solução de glucana 2% ou laminarina 2% diluídas em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5, foram adicionados 50µL do tampão com o pH desejado e 100 µL de extrato bruto. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. A ela foi então acrescentado 800 µL do reagente DNS. O sistema foi fervido por 5

minutos e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A atividade enzimática foi mensurada em UI (unidade internacional), correspondendo a 1 μmol de açúcar redutor produzido por minuto. O controle da reação foi feito utilizando-se o mesmo extrato bruto fervido por 10 minutos.

3.8 Purificação de uma β -1,3-glucanase do meio de cultura de CEN62

3.8.1 Concentração das amostras de β -1,3-glucanase

Amostras de sobrenadante de culturas (extrato bruto) obtidas conforme descrito anteriormente, seção 3.4, foram concentradas por ultrafiltração, utilizando-se uma membrana com retenção de 30kDa (AMICON – PM 30), pressão de 1,5 kgf/cm². O sistema foi mantido a 4°C durante o processo de filtração, e a atividade de β -1,3-glucanase monitorada no filtrado e no concentrado.

3.8.2 Teste de adsorção em resinas de troca iônica

Quatro resinas de troca iônica foram testadas quanto à capacidade de adsorver a β -1,3-glucanase presente no meio de cultura. As resinas utilizadas foram CM-, SP-, Q- e DEAE- Sepharose, as quais foram lavadas com água destilada. O sistema consistiu em 500 μL de suspensão de resina dissolvida em 500 μL de tampão e 100 μL de amostras do meio de cultura. Os diferentes tampões foram preparados de modo a atender uma faixa de pH de 3,0 a 8,5 conforme descrito abaixo:

- Tampão acetato de sódio 50mM para a faixa de pH de 3,0 a 5,5
- Tampão fosfato de sódio 50mM para a faixa de pH de 6,0 a 7,0
- Tampão Tris-HCl 50mM para a faixa de pH de 7,5 a 8,5.

Os sistemas foram incubados por 10 minutos em banho de gelo, em seguida, centrifugou-se para separar as fases, e a atividade enzimática do sobrenadante foi dosada conforme descrito anteriormente (seções 3.5.2 e 3.5.3.). Depois de realizado o ensaio, adicionaram-se ao precipitado 500 μ L de tampão contendo NaCl 0,5M e após 10 minutos em banho de gelo, centrifugou-se, sendo o ensaio enzimático efetuado novamente, utilizando-se o sobrenadante.

3.8.3 Cromatografia de troca iônica em S- Sepharose

As amostras (5mL), após concentradas e dialisadas contra água destilada foram aplicadas em uma coluna de troca iônica S-Sepharose (3.0x15cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 100mM pH 8,0 A coluna foi então submetida a um gradiente de NaCl (0-0,5M). Frações de 2 ou 5mL por tubo foram coletadas a 4,0°C com um fluxo de 60 mL.h⁻¹. As frações que apresentaram atividade de β -1,3-glucanase foram coletadas, concentradas e dialisadas contra água destilada.

3.8.4 Cromatografia de troca iônica em DEAE- Sepharose

As amostras (10mL), após concentradas e dialisadas contra água destilada foram aplicadas em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose (3.0x15cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 100mM pH 8,0 A coluna foi então submetida a um gradiente de NaCl (0-0,5M). Frações de 5mL por tubo foram coletadas a 4,0°C com um fluxo de 60 mL.h⁻¹. As frações que apresentaram atividade de β -1,3-glucanase foram coletadas, concentradas e dialisadas contra água destilada.

3.8.5 Caracterização eletroforética

O perfil eletroforético de amostras de proteínas foi analisado em gel de poliacrilamida (12% e 15 %), em condições desnaturantes (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 (10x8 cm). Com o término da corrida eletroforética, o gel foi corado para proteína com duas técnicas diferentes.

Com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987), o gel foi deixado em solução descorante de 50%(v/v) metanol e 12%(v/v) ácido acético glacial por um período mínimo de duas horas, sob agitação. Após esta etapa, a solução foi trocada por uma outra de 50%(v/v) etanol (trocada 3 vezes a cada 20 minutos). Na etapa seguinte, o gel foi incubado em uma solução de 0,02% (p/v) de tiosulfato de sódio durante 1 minuto e lavado três vezes com água destilada antes de ser incubado em solução de 0,2% (p/v) de nitrato de prata. Após um período de 20 minutos, o gel foi lavado exaustivamente com água destilada e então imerso em solução reveladora de 6,0% (p/v) de carbonato de sódio contendo 50 μ L de formaldeído a 37% (v/v), e 1mL da solução de tiosulfato de sódio, até a visualização das proteínas. A reação foi interrompida com solução descorante por 20 minutos, sendo o gel conservado nessa mesma solução descorante.

Com o método do Coomassie coloidal, o gel foi deixado em solução contendo coomassie G250 0,1%(p/v), ácido fosfórico 2% (v/v), sulfato de amônio 10% (p/v) e metanol 20% (v/v). Após seis hora o gel foi lavado três vezes com água destilada e armazenado em solução de glicerol 10% (v/v).

O marcador molecular utilizado no decorrer deste trabalho foi “BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder” da Invitrogen, e de número de catálogo 10748-010.

3.9 Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas nas amostras foram determinadas em triplicatas por um método colorimétrico (Bradford, 1976), utilizando albumina bovina como padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Produção de glicosil hidrolases por *D. pulvinata*

4.1.1 Perfil de atividade enzimática no isolado CEN 93

O isolado CEN 93 de *D. pulvinata* foi avaliado quanto a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. A atividade β -1,3-glucanase presente no sobrenadante do meio de cultura após crescimento em meio contendo quitina como fonte de carbono foi de 0,182 UI/mL (figura 5). Entretanto as maiores atividades, tanto de β -1,3-glucanase como de β -1,3-1,4-glucanase, foram encontradas associadas à fração solúvel do micélio macerado. Os valores de atividade obtidos foram de 0,567 UI/mL e 0,346 UI/mL respectivamente (figura 6).

Ficou evidente que a fração solúvel do micélio apresenta atividade de quitinase com um nível máximo detectado no décimo terceiro dia (0,760 UI/mL) (figura 6), no entanto, apresentou a maior atividade enzimática na fração insolúvel do micélio (figura 7).

Foi observado também que a fração solúvel do micélio apresenta um pico de atividade enzimática β -1,3- e β -1,3-1,4-glucanases e quitinase no décimo terceiro dia.

As três frações foram analisadas para atividade de celulase (β -1,4-glucanase), mas nenhuma das três frações apresentou atividade (dados não mostrados).

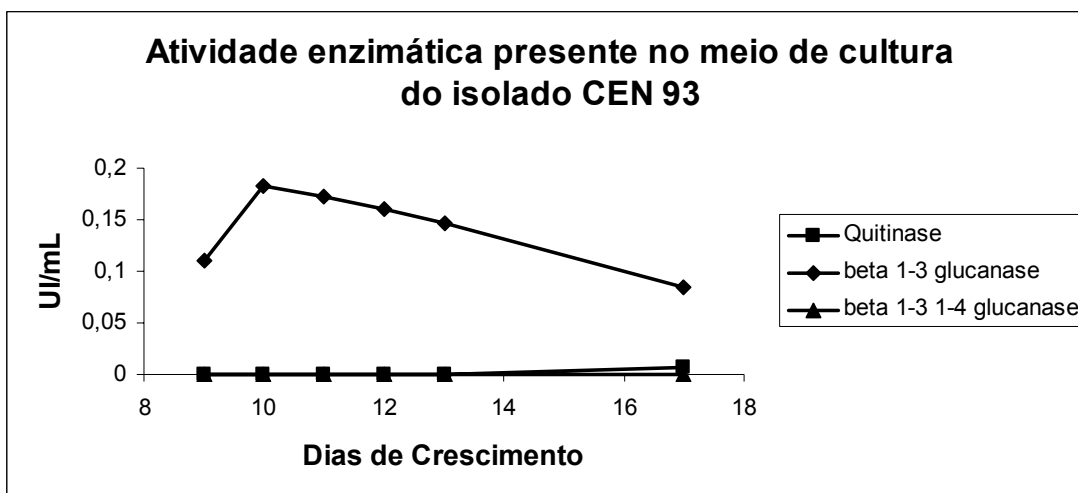


Figura 5 Perfil de atividade enzimática encontrado no meio de cultura do isolado CEN93 de *D. pulvinata* para os substratos quitina, laminarina (β -1,3-glucana) e β -1,3-1,4-glucana após diferentes tempos de crescimento em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono.

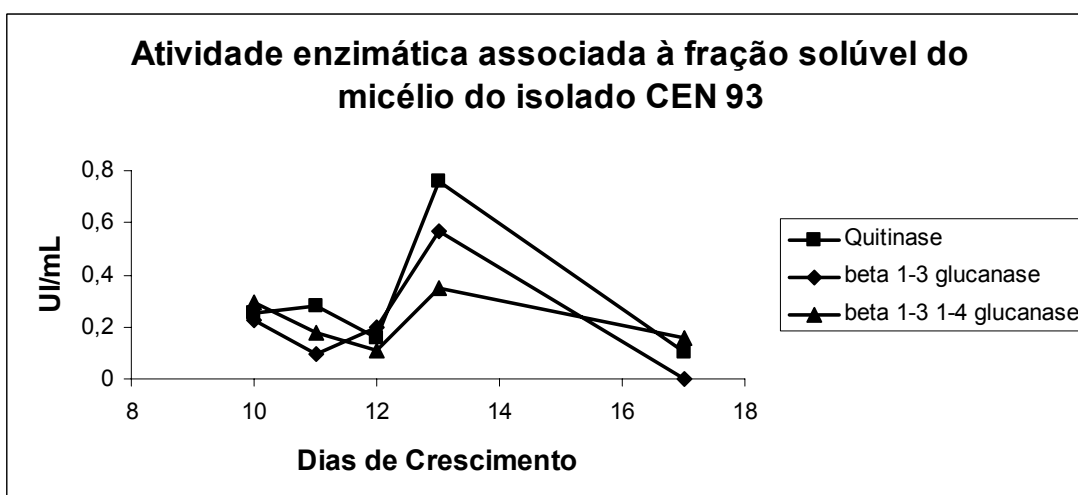


Figura 6 Perfil de atividade enzimática encontrado na fração solúvel do micélio macerado de do isolado CEN93 de *D. pulvinata* para os substratos quitina, laminarina (β -1,3-glucana) e β -1,3-1,4-glucana, após diferentes tempos de crescimento em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono.

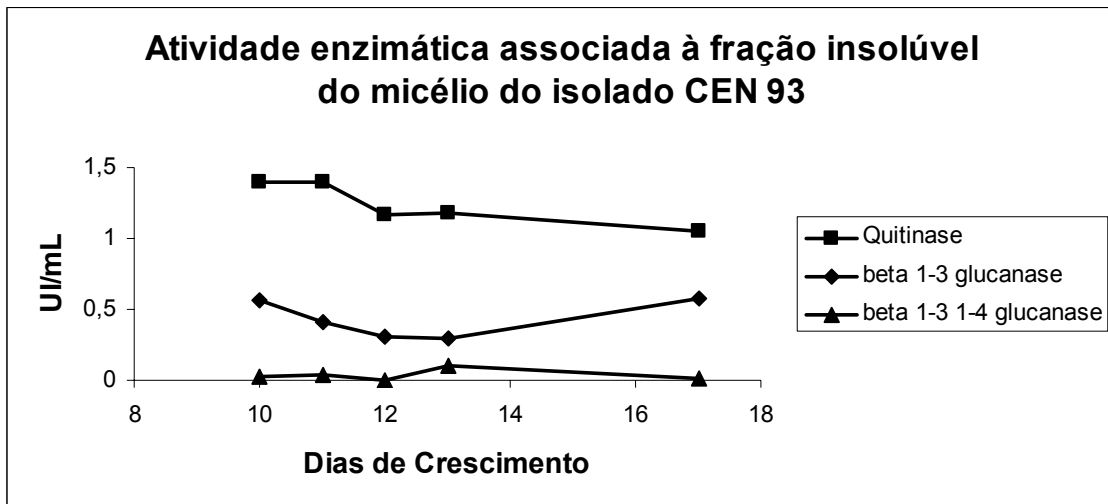


Figura 7: Perfil de atividade enzimática encontrado na fração insolúvel do micélio macerado de do isolado CEN93 de *D. pulvinata* para os substratos quitina, laminarina (β -1,3-glucana) e β 1,3 1,4 glucana, após diferentes tempos de crescimento em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono.

4.1.2 Perfil de atividade enzimática no isolado CEN 62

O isolado CEN62 de *D. pulvinata* também foi avaliado quanto a sua capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, β -1,3-, β -1,3-1,4-glucanases, quitinase e celulase (β 1,4 glucanase). A maior atividade tanto de β -1,3-glucanase como de β -1,3-1,4-glucanase encontradas no sobrenadante do meio de cultura foram de 2,02 UI/mL e 2,42 UI/mL respectivamente, após 10 dias de crescimento (figura 8). No meio de cultura não foram encontradas atividade quitinolítica (figura 8) ou celulolítica (dados não mostrados).

A fração solúvel do micélio apresentou uma atividade enzimática do tipo β -1,3 e β -1,3-1,4-glucanase moderada (figura 9), se comparada à atividade vista no sobrenadante do meio de cultura (figura 8) ou na fração insolúvel do micélio (figura 10). Foram vistos dois picos de atividade máxima de β -1,3-glucanase e β -1,3-1,4-glucanase (1,63 UI/mL e 2,55 UI/mL respectivamente) no sexto dia, havendo uma queda e logo em seguida os níveis de atividade retomam (figura 9). A fração solúvel do micélio não mostrou atividades quitinolítica ou celulolítica (dados não mostrados).

Na fração insolúvel do micélio foram encontradas altas atividades de β -glucanase, sendo 3,17 UI/mL para β -1,3-glucanase e 3,47 UI/mL para β -1,3-1,4-glucanase, a partir do sétimo dia de crescimento em meio indutor com quitina como fonte de carbono (figura 10). Na fração insolúvel do micélio também foi encontrada atividade quitinolítica (0,32 UI/mL) no sétimo dia de crescimento (figura 11), mas nenhuma atividade celulolítica (dados não mostrados). O isolado CEN62 apresentou também atividade quitinolítica na fração insolúvel do micélio (figura 11).

Considerando os resultados obtidos o isolado CEN62 foi escolhido para as posteriores etapas de purificação da enzima β glucanase, dada a atividade presente no sobrenadante do meio de cultura.

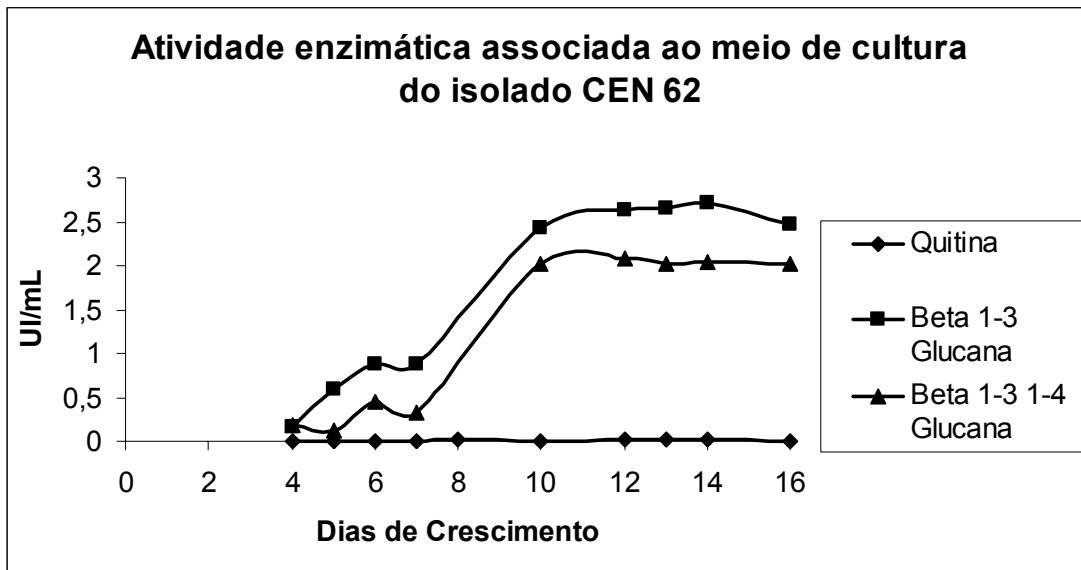


Figura 8: Perfil de atividade enzimática encontrado no meio de cultura do isolado CEN93 de *D. pulvinata* para os substratos quitina, laminarina (β -1,3-glucana) e β -1,3-1,4-glucana após diferentes tempos de crescimento em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono.

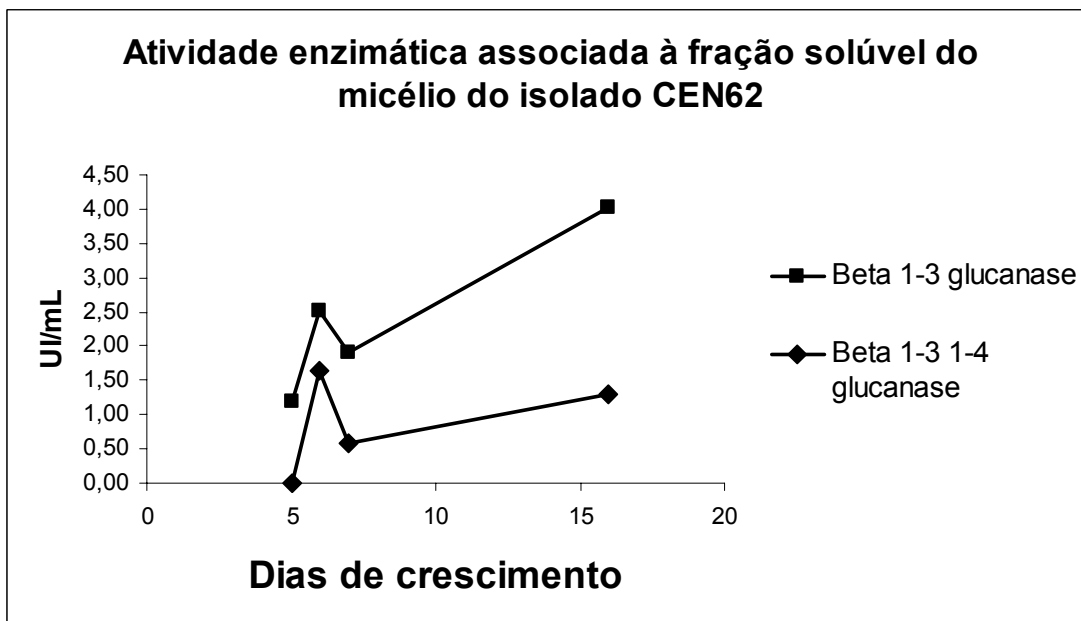


Figura 9: Perfil de atividade enzimática encontrado na porção solúvel do micélio do isolado CEN62 de *D. pulvinata* para os substratos laminarina (β -1,3-glucana) e β -1,3-1,4-glucana após diferentes tempos de crescimento em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono.

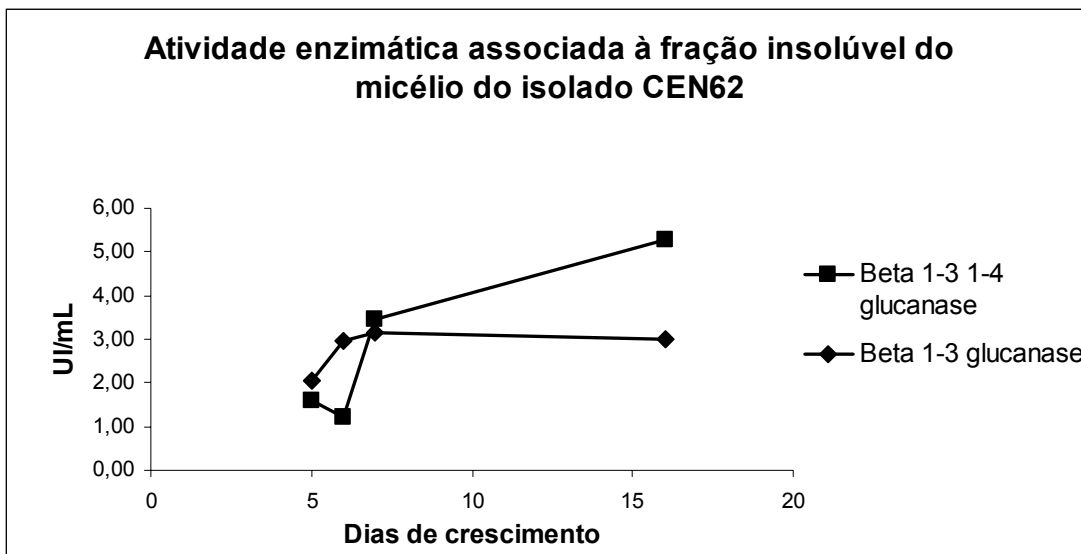


Figura 10: Perfil de atividade enzimática encontrado na porção insolúvel do micélio do isolado CEN62 de *D. pulvinata* para os substratos laminarina (β -1,3-glucana) e β -1,3-1,4-glucana após diferentes tempos de crescimento em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono.

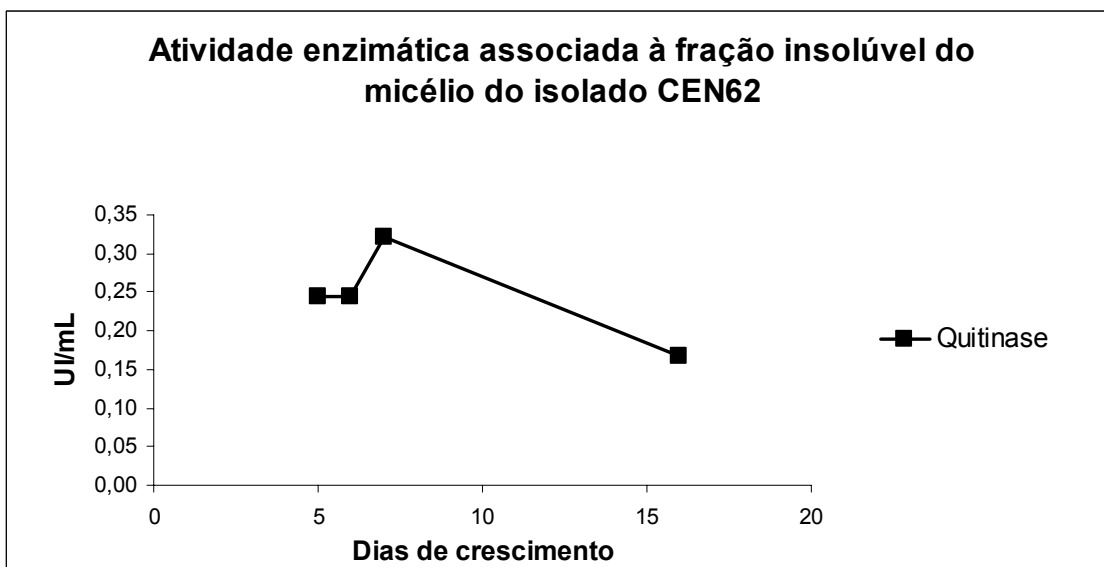


Figura 11: Perfil de atividade enzimática encontrado na porção insolúvel do micélio do isolado CEN62 de *D. pulvinata* para o substrato quitina após diferentes tempos de crescimento em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono.

4.2 Adição de PMSF no meio de cultura do isolado CEN62

Considerando que não há atividade quitinolítica no sobrenadante do meio de cultura, foi realizado um experimento para verificar se essa ausência de atividade poderia ser explicada pela presença de proteases no meio de cultura. A ação dessas proteases poderia também estar interferindo com a atividade de β glucanase. Para verificar essa hipótese foi adicionado ao meio de cultura, nos diferentes dias de crescimento, no momento da separação do micélio, o inibidor de protease PMSF.

Foi observado que a adição do PMSF não teve interferência significativa com a atividade de degradação de laminarina (β -1,3-glucanase) (figura 12), nem de β -1,3-1,4-glucana (figura 13).

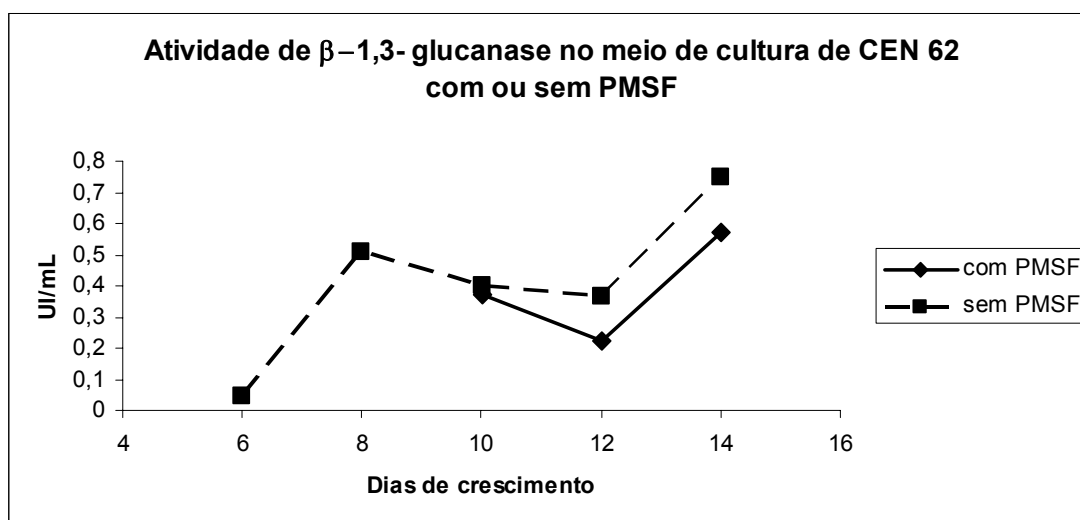


Figura 12: Atividade β -1,3-glucanase no meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido por diferentes tempos em meio contendo quitina como fonte de carbono, e um inibidor de proteases (PMSF) adicionado ao meio no momento da separação do micélio.

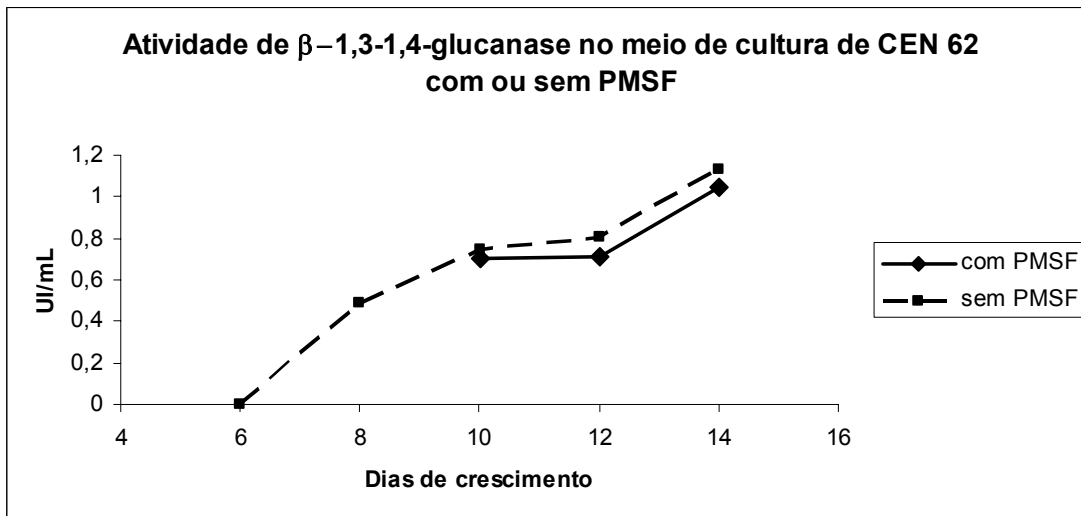


Figura 13: Atividade de β -1,3-1,4-glucanase no meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido por diferentes tempos em meio contendo quitina como fonte de carbono, e um inibidor de proteases (PMSF), adicionado ao meio no momento da separação do micélio.

4.3 Influência da adição de detergente no macerado do micélio de CEN 62

No intuito de liberar eficientemente a enzima quitinase associada ao micélio foi preparada uma solução estoque (0,1%) de Tween 80. Em seguida, o micélio crescido por 7 dias em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono, foi macerado, ressuspenso em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, sendo o sobrenadante obtido por centrifugação. O precipitado foi então ressuspenso em 20 mL do mesmo tampão contendo diferentes quantidades da solução estoque de Tween. O segundo sobrenadante foi então obtido por uma segunda centrifugação. Os dois sobrenadantes foram então testados para atividade quitinase. O primeiro sobrenadante, por não possuir Tween 80, foi utilizado como controle.

Tabela 3: Influência do detergente Tween 80 na dissociação da atividade quitinolítica associada ao micélio do isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido por 7 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono.

Volume de Solução de Tween 80	Primeiro sobrenadante (Sem Tween 80) (UI/mL)	Segundo sobrenadante (Com Tween 80) (UI/mL)	Razão (2ºsob/1ºsob)
10 µL	0,00112	0,00032	0,285
50 µL	0,00127	0,00081	0,636
100 µL	0,00127	0,00082	0,644
200 µL	0,00102	0,00053	0,518
500 µL	0,00107	0,00083	0,772
1 mL	0,00130	0,00075	0,579

Foi verificado que mesmo as maiores concentrações de Tween 80 não foram capazes de liberar a enzima associada ao micélio do isolado CEN62, mais ainda, houve uma redução na atividade enzimática quando comparamos o segundo sobrenadante com o primeiro, conforme indica a razão entre a atividade enzimática do segundo sobrenadante sobre a atividade do primeiro.

4.4 Lise do micélio por Ultra-som

O micélio do isolado CEN62 crescido em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono foi macerado, ressuspensão em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, e foi centrifugado sendo o precipitado separado do sobrenadante. O precipitado foi então “sonicado” por três seções de 30 segundos, com intervalos de um minuto e meio cada. A amostra foi mantida no gelo durante todo o processo. Foi utilizada a potência de 100% do aparelho 50T da GE, e então o precipitado foi mais uma vez ressuspensão em tampão, e o precipitado separado do sobrenadante por centrifugação. Assim foram obtidas quatro frações, o sobrenadante do primeiro macerado, o precipitado do primeiro macerado, o sobrenadante do sonicado e o precipitado do sonicado. Os quatro tiveram sua atividade quitinase quantificada.

Tabela 4: Atividade quitinolítica de diversas frações do micélio de CEN62 de *D. pulvinata* crescido por 7 dias em meio de cultura contendo quitina como fonte de carbono. As frações foram obtidas por maceração e sonicação.

Fração	Atividade quitinolítica (UI/mL)
1º Sobrenadante do macerado	0,00179
1º Precipitado do macerado	0,3112
2º Sobrenadante do sonicado	0,00096
2º Precipitado do sonicado	0,0102

Foi observado que após a sonicação o micélio permanecia sem liberar a enzima quitinase. Foi notória também a perda de atividade do precipitado após o procedimento de sonicação.

4.5 Caracterização da β glucanase presente no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono

4.5.1 Influência da temperatura

Foi observado que o meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata*, após crescimento por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono, apresentou a maior atividade de β -1,3-glucanase na faixa de temperatura entre 55°C e 65°C, tendo um pico de atividade a 60°C (0,78 UI/mL)(figura 14). Para β -1,3-1,4-glucanase a maior atividade foi encontrada na temperatura de 50°C (0,3 UI/mL)(figura 14).

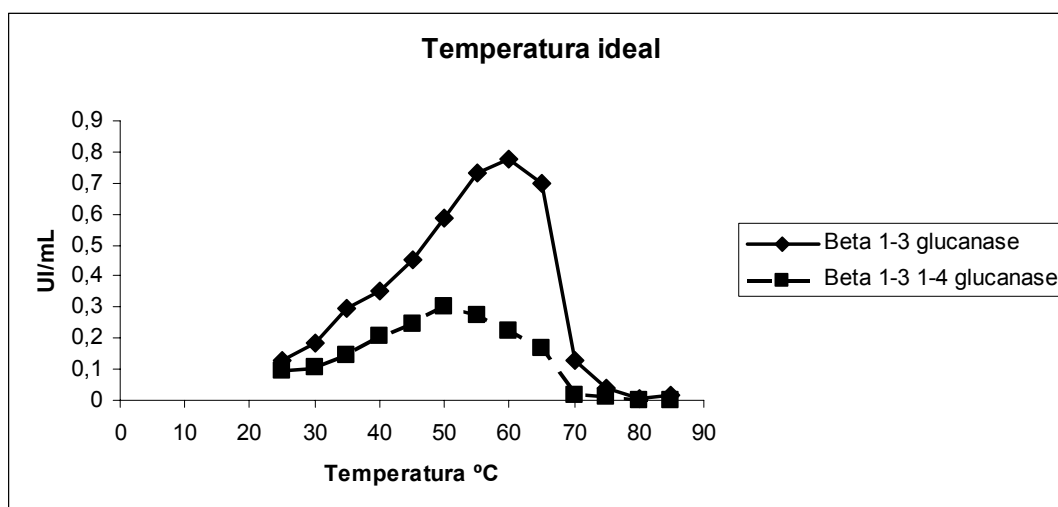


Figura 14: Influência da temperatura na atividade β -1,3 e β -1,3-1,4-glucanase no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* após crescimento por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono.

4.5.2 Influência do pH

Foi observado que o sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono, apresentou a maior atividade na abrangente faixa de pH entre 4,5 e 8,0 para atividade β -1,3-glicanase, a 37°C. Fica evidente também um pico de atividade nos pH 5,5 e 7,0 (0,240 UI/mL e 0,244 UI/mL respectivamente) (figura 15).

Para a β -1,3-1,4-glicanase as maiores atividades foram medidas na faixa de pH de 4,5 a 6,5 (figura 15).

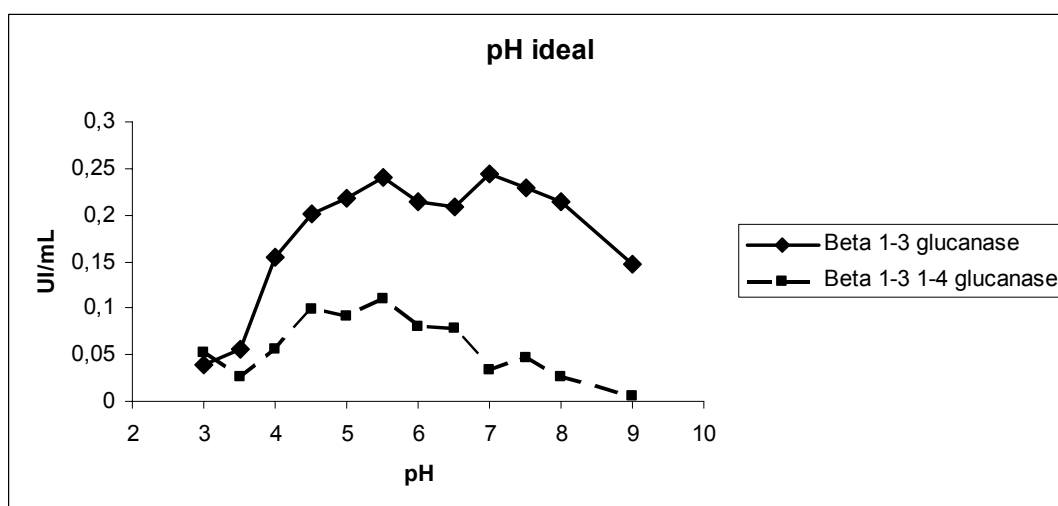


Figura 15: Influência do pH na atividade de β -1,3 e β -1,3-1,4-glicanase presente no meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* após crescimento por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono.

4.5.3 Termoestabilidade

Para verificar a estabilidade da atividade de β -1,3-glicanase presente no meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* após crescimento por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono, uma amostra do sobrenadante de cultura foi incubada em diferentes temperaturas antes de ter a atividade determinada. A termoestabilidade da enzima β -1,3-glicanase foi verificada em três diferentes temperaturas, 60°C, 70°C e 80°C. Na temperatura de 60°C não houve perda de atividade enzimática por até 3 dias (figura 16), porém o tempo de meia vida para as temperaturas de 70°C e 80°C foi de 10 minutos e 1 minuto, respectivamente (figura 16).

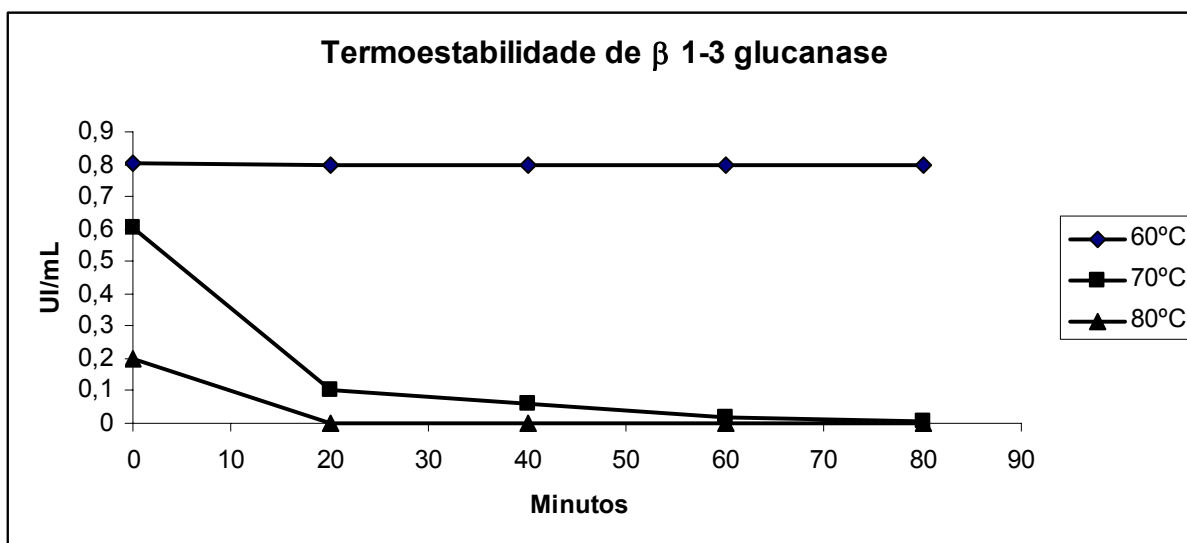


Figura 16: Termoestabilidade da atividade de β -1,3-glicanase presente no meio de cultura do isolado CEN62 de *D. pulvinata* após crescimento por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono.

4.6 Purificação da β -1,3-glucanase produzida pelo isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono e secretada no sobrenadante do meio de cultura

No processo de purificação foram utilizados procedimentos de ultrafiltração, diálise e cromatografia de troca iônica (figura 17).

No procedimento de ultrafiltração, somente a amostra retida em membrana de exclusão de 30 kDa apresentou atividade de β -1,3-glucanase. Esta amostra foi utilizada para posterior purificação da enzima. Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do concentrado da ultrafiltração, o que demonstrou a presença de um “pool” de proteínas de diversos tamanhos, sendo uma banda mais forte, correspondendo a 40 KDa (figura 18).

Para a escolha da resina de cromatografia de troca iônica adequada para as etapas de purificação da β -1,3-glucanase foram realizados testes de adsorção da enzima, com várias resinas em diferentes condições de pH.

A β -1,3-glucanase apresentou uma maior afinidade por resinas de caráter aniônico (DEAE-Sepharose), principalmente em pH entre 7,0 e 8,0. Em resinas de caráter catiônico (principalmente S-Sepharose) houve maior atividade no sobrenadante, antes da adição de sal, em pH entre 7,0 e 8,5 (dados não mostrados).

A resina S-Sepharose foi então escolhida por apresentar a maior porcentagem de retenção da atividade enzimática quando comparada às outras resinas testadas.

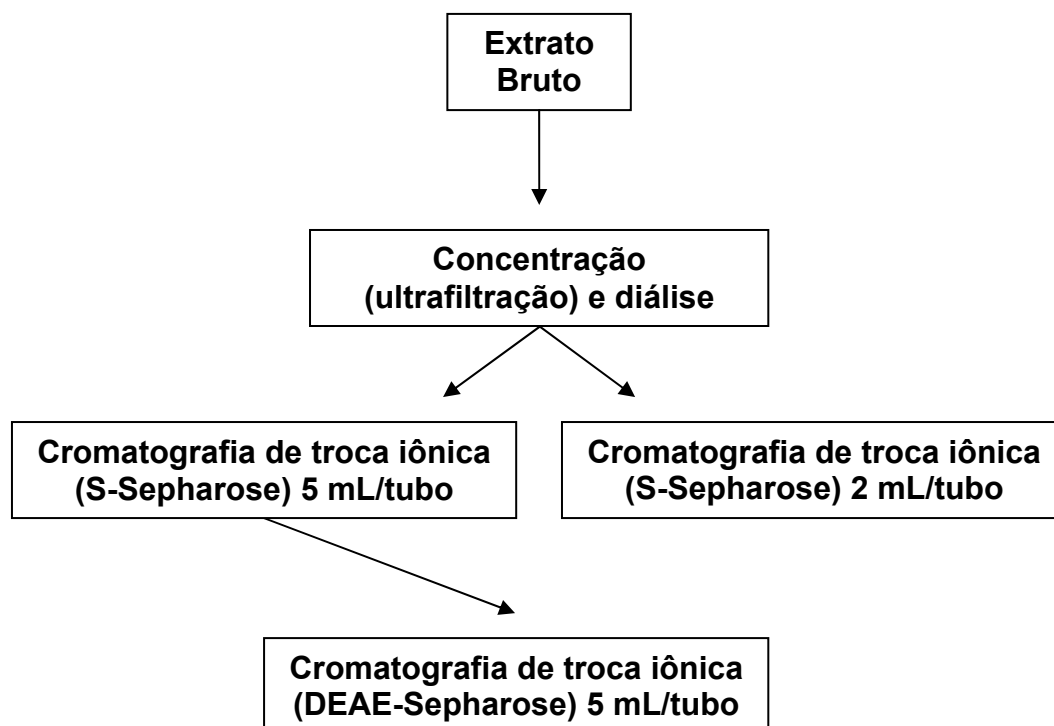


Figura 17: Fluxograma das etapas de purificação da enzima β -1,3-glucanase produzida pelo isolado CEN62 de *D. pulvinata* crescido em meio contendo quitina como fonte de carbono

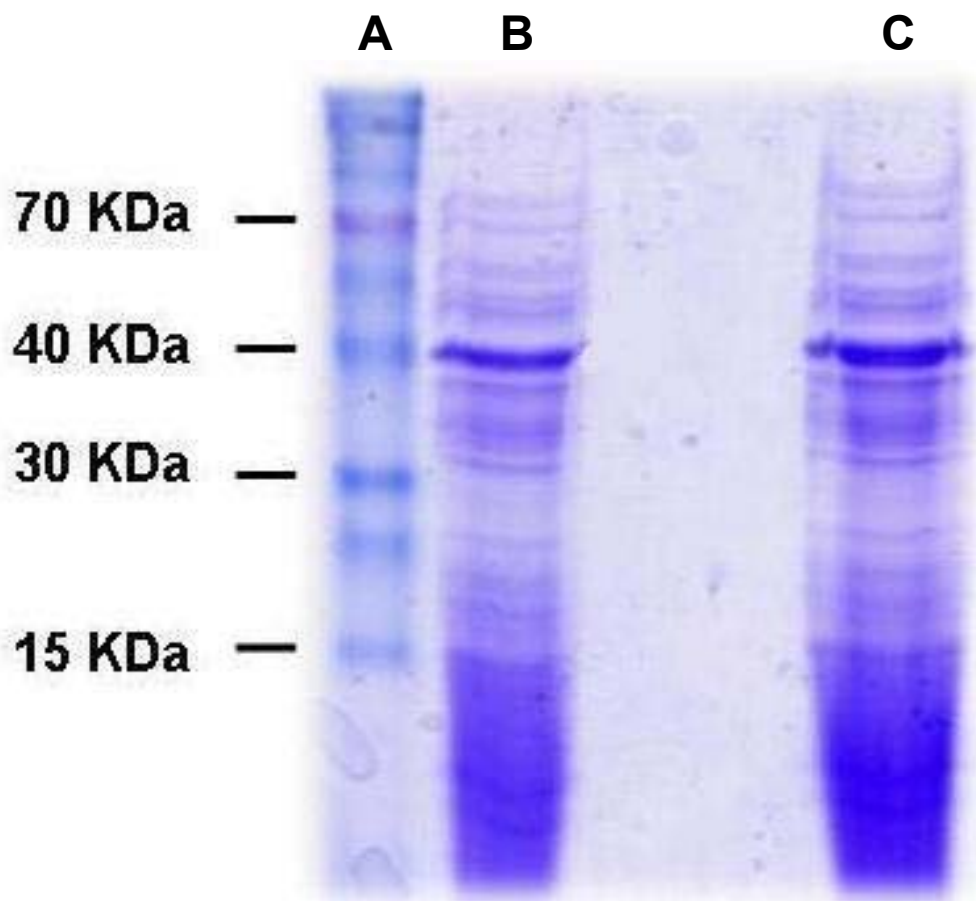


Figura 18: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15%, corado com coomassie coloidal, da amostra do concentrado em membrana de ultrafiltração de 30 KDa do sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 crescido por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono. Poços A: marcador molecular Benchmark Invitrogen; B e C: concentrado da ultrafiltração.

4.6.1 Cromatografia de troca iônica (S-Sepharose)

Foi realizada uma cromatografia em coluna de troca iônica em S-sepharose coletando 5 mL de eluato por tubo. O perfil de atividade β -1,3-glucanase após cromatografia nesta coluna com resina S-Sepharose é apresentado na figura 19. A eluição inicial com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 resultou em um grande pico de atividade β -1,3-glucanase (PS1) ladeado por dois grandes picos de proteína. A eluição posterior, com um gradiente linear crescente de NaCl (0-0,5M) não resultou em mais eluição de proteínas e nem de atividade, mesmo com a lavagem da coluna com o mesmo tampão e concentração de NaCl de 1,0M.

A fração sete do eluato de S-sepharose, correspondente ao pico PS1, foi analisada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (figura 20), revelando a presença de pelo menos seis bandas de massas moleculares entre 25 e 65kDa, comprovando uma eficiente purificação em relação ao concentrado por ultrafiltração (figura 18).

Na tentativa de realizar um método mais eficiente de purificação foi realizada uma nova corrida em S-Sepharose, a partir do concentrado por ultrafiltração, sendo coletado 2 mL por tubo, cujo perfil de atividade de β -1,3-glucanase pode ser visto na figura 21. Foi analisada apenas a eluição inicial com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, sem adição de NaCl. Foi obtido um pico de atividade (PS2) composto pelas frações 14-17 do eluato. Essas frações foram analisadas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), figura 22, revelando quatro bandas mais evidentes na fração 14 (20, duas em torno de 40 e 50 kDa) e cinco bandas nas demais frações (20 kDa, e quatro entre 40 e 50 kDa)

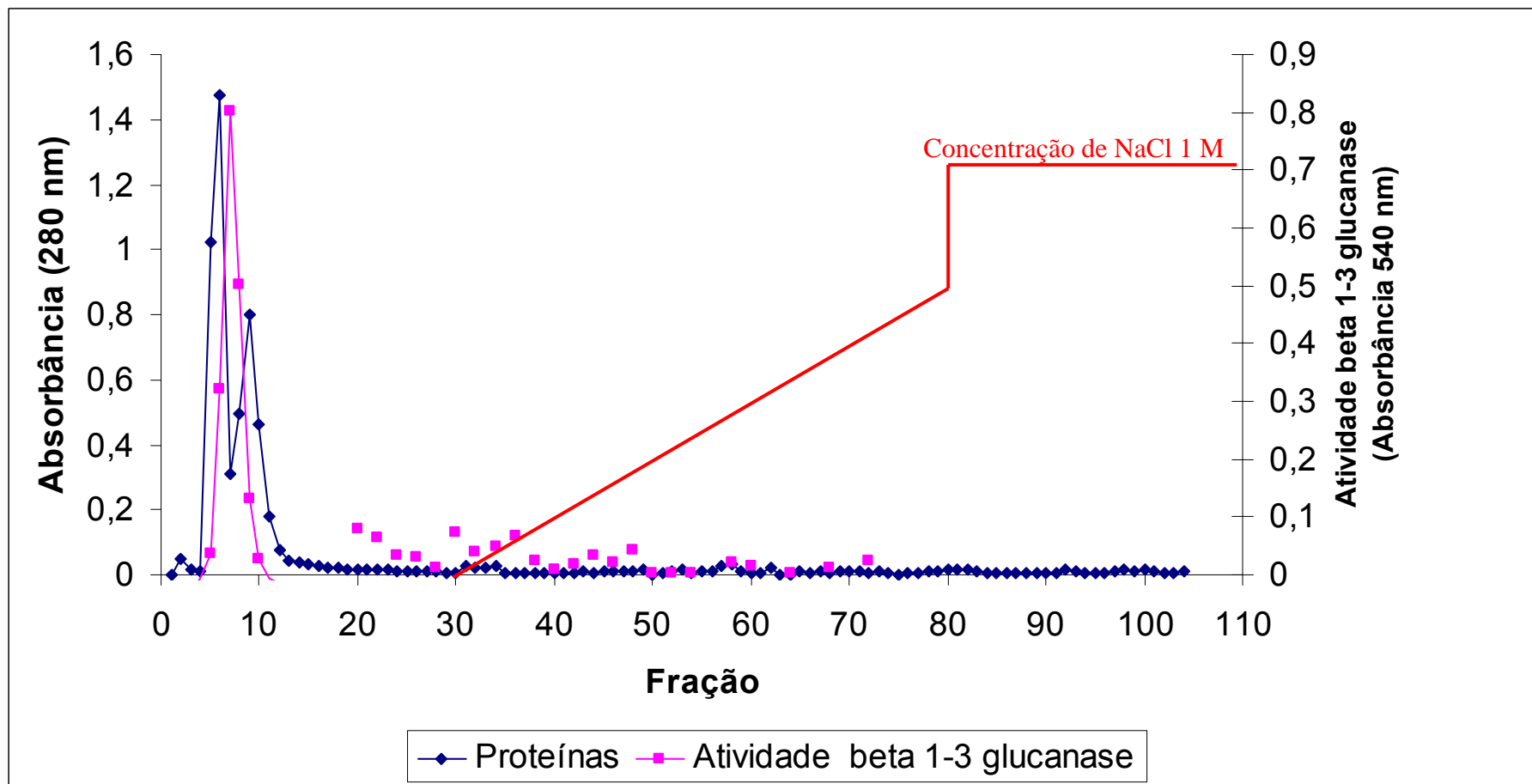


Figura 19: Perfil cromatográfico da amostra de β -1,3-glucanase proveniente do concentrado por ultrafiltração com membrana de 30 Kda, em coluna de S-Sepharose. As frações de 0 a 30 foram eluídas em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 apenas, as frações de 30 a 80 com gradiente crescente de 0 a 0,5 M de NaCl, e as frações de 80 a 105 com tampão com concentração de NaCl de 1,0 M

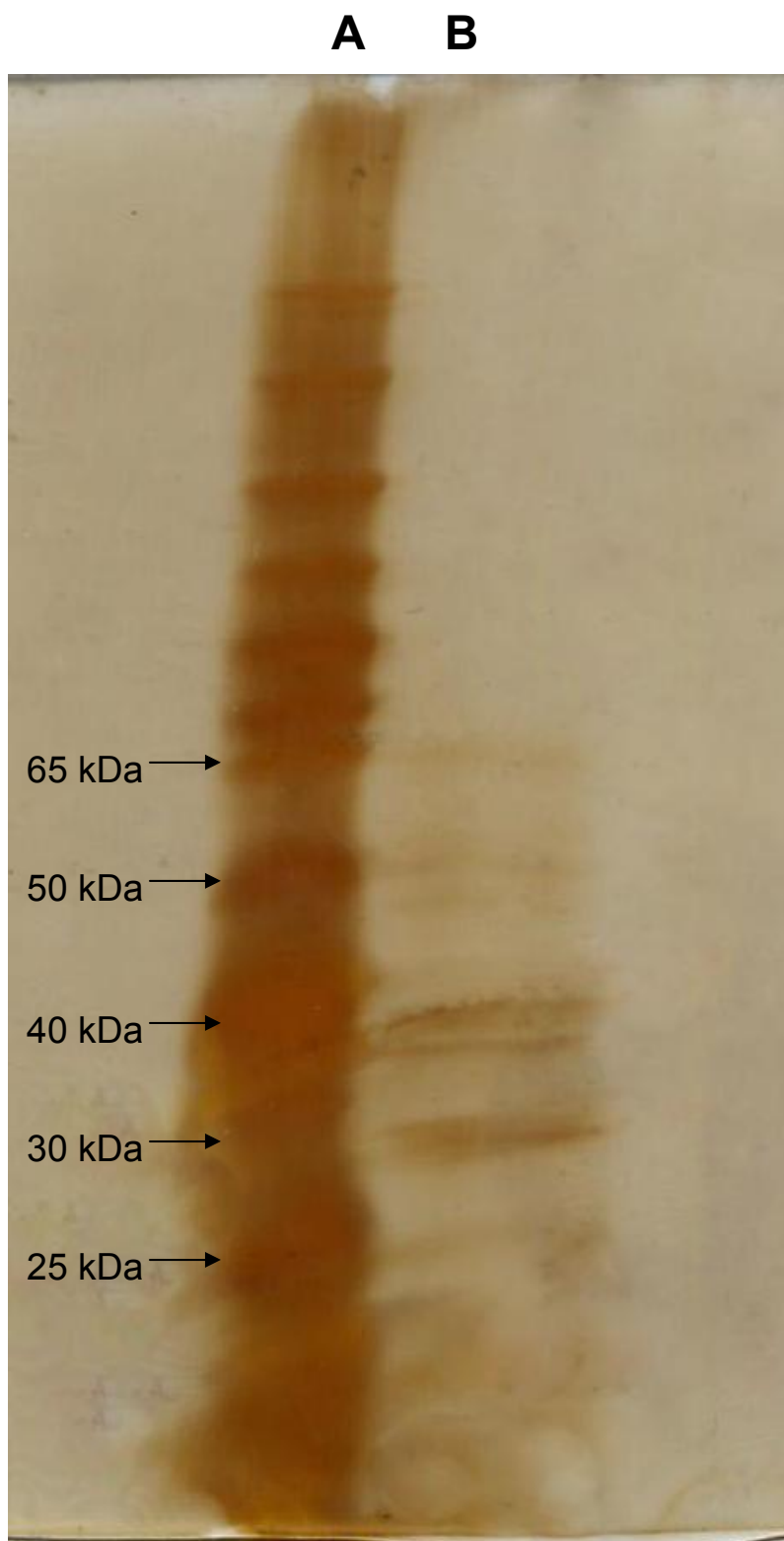


Figura 20: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15%, corado com nitrato de prata, da amostra dos eluatos de PS 1 provenientes do concentrado de ultrafiltração de membrana 30 KDa Poços A: Marcador molecular Benchmark Invitrogen; B: Fração 7 de PS 1.

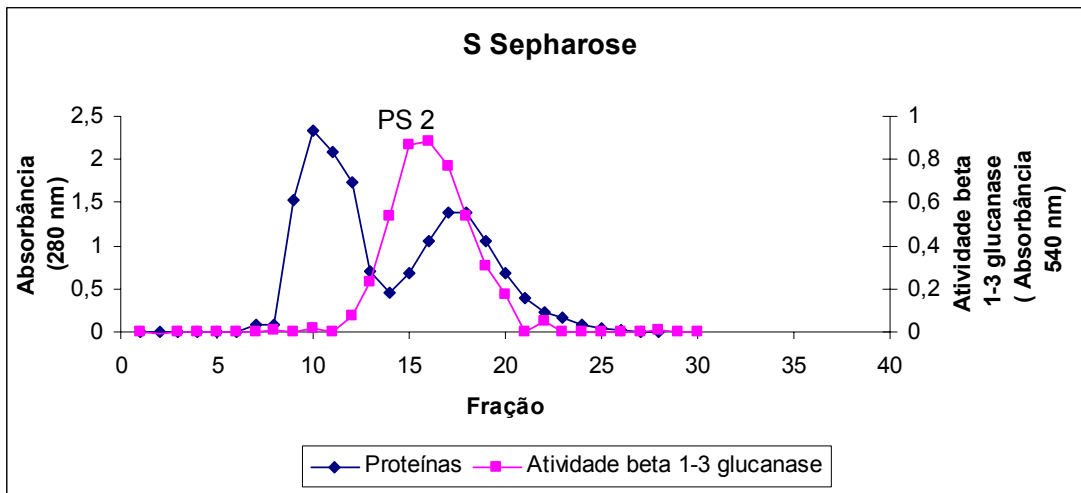


Figura 21: Perfil cromatográfico da amostra de β -1,3-glucanase proveniente do concentrado por ultrafiltração com membrana de 30 kDa, em coluna de S-Sepharose, sendo coletado 2mL por tubo. As frações de 0 a 30 foram eluídas em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 apenas.

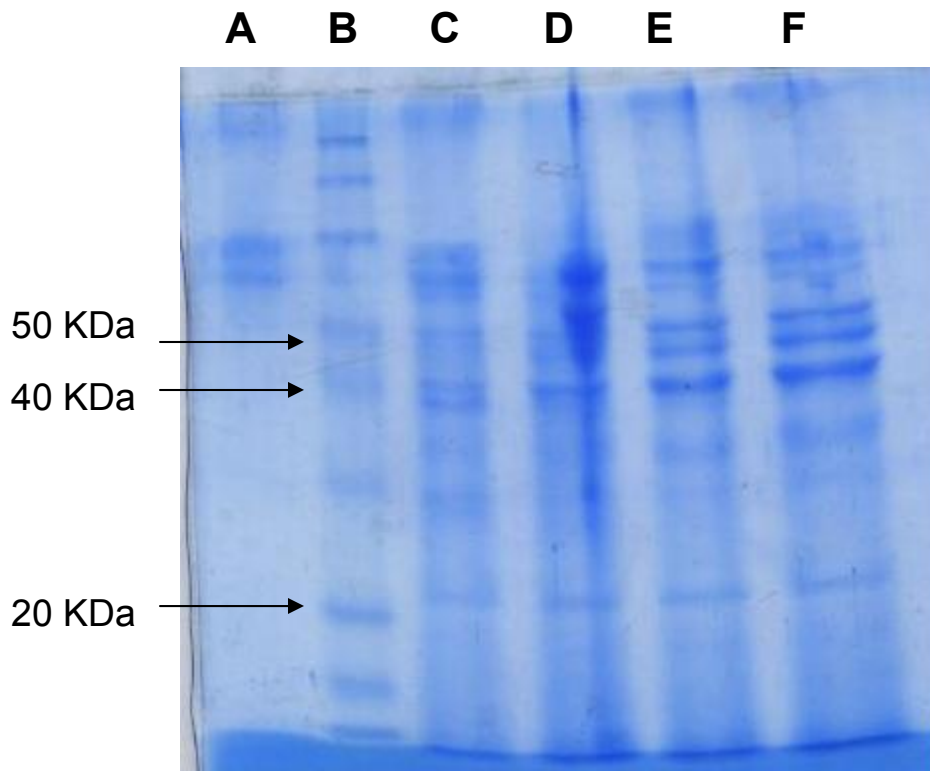


Figura 22: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15%, corado com coomassie coloidal, da amostra dos eluatos de PS 2 provenientes do concentrado de ultrafiltração de membrana 30 KDa Poços A: Tampão de amostra; B: Marcador molecular Benchmark Invitrogen; C-F: Frações 14, 15, 16 e 17 de PS 2 respectivamente.

4.6.2 Cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose)

Foi realizada uma cromatografia em coluna de troca iônica em DEAE-sepharose coletando 5 por tubo mL a partir do concentrado do eluato do pico PS1 (fração sete) obtido por cromatografia em S-Sepharose. O perfil de atividade de β -1,3-glucanase em coluna com esta resina DEAE-Sepharose é apresentado na figura 24. A eluição inicial com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 resultou em frações contendo proteínas sem atividade enzimática para β -1,3-glucanase. A eluição posterior, com um gradiente linear crescente de NaCl (0-0,5M) resultou em pico de atividade (PD1) com ápice na fração 50 do eluato. A lavagem da coluna com o mesmo tampão com concentração de NaCl 1,0M resultou em frações contendo proteínas sem atividade enzimática.

As frações 49, 50 e 51 do eluato de DEAE-sepharose, correspondentes ao pico PD1, foram analisadas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), figura 24, revelando três bandas mais evidentes de massas moleculares aproximadas de 37, 42 e 50 kDa.

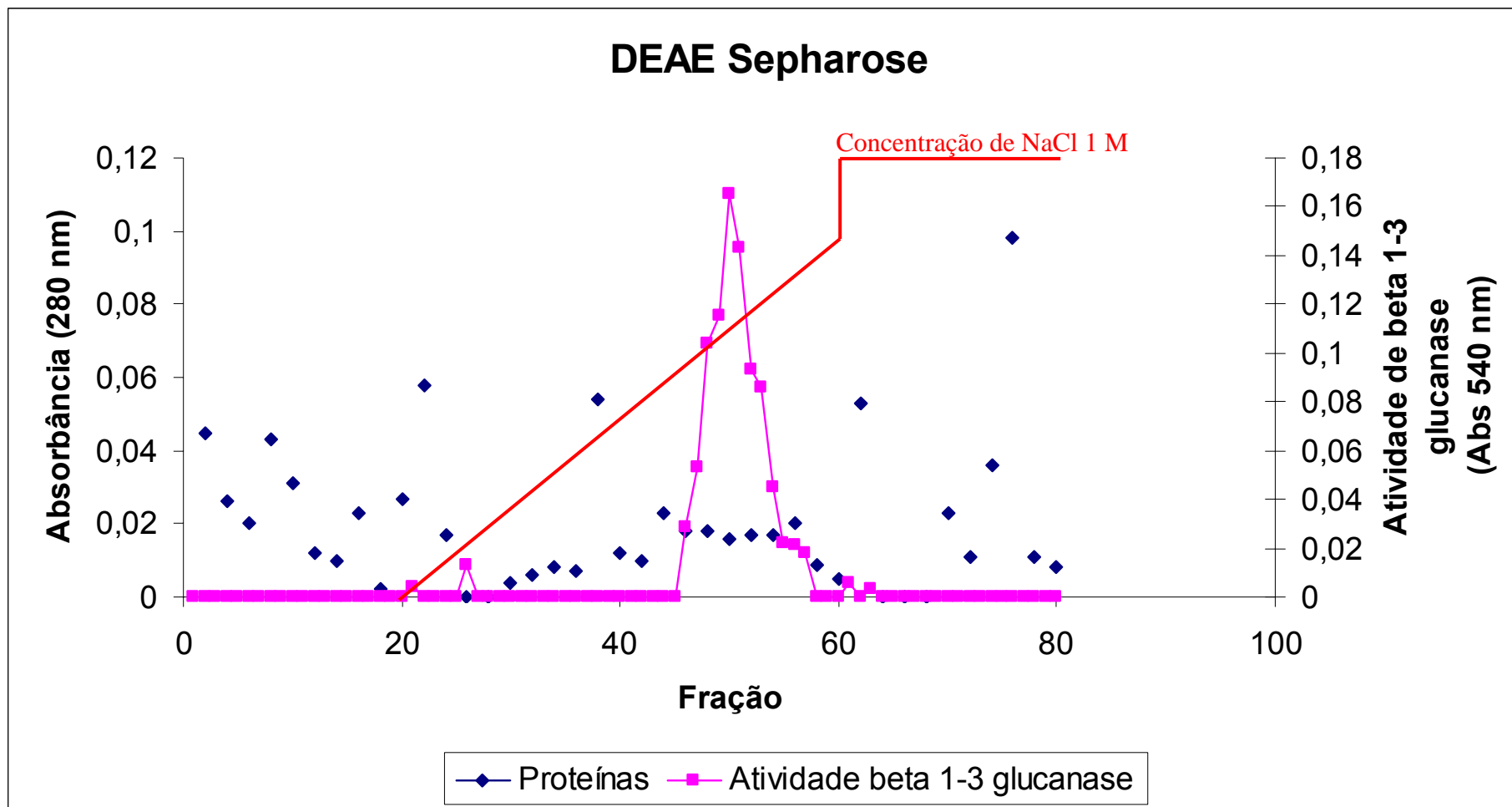


Figura 23: Perfil cromatográfico da amostra de β -1,3- glucanase proveniente da fração 7 (PS 1) do eluato da coluna de S-Sepharose (figura 19). As frações de 0 a 20 foram eluídas em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 apenas, de 20 a 60 em gradiente crescente de 0 a 0,5 M de NaCl, e de 60 a 80 em tampão com concentração de NaCl de 1,0 M

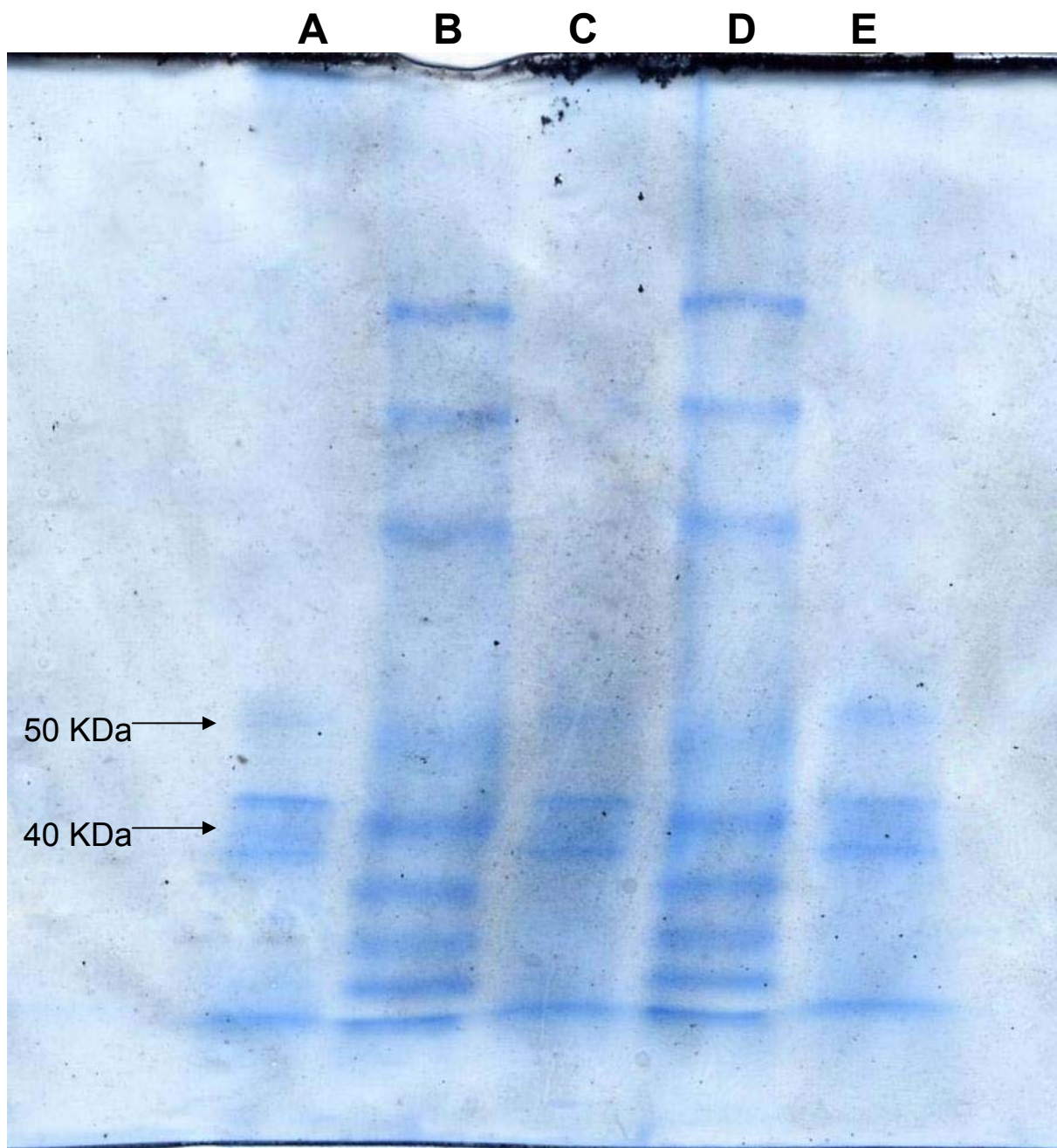


Figura 24: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15%, corado com coomassie coloidal, da amostra dos eluatos de PD1 provenientes da fração 7 de PS 1. Poços A, C e E: Frações 49, 50, 51 de PD 1 respectivamente ; B e D: Marcador molecular Benchmark Invitrogen.

4.6.3 Tabela de rendimento do processo de purificação

O resumo do processo de purificação está apresentado na tabela 5. Até a presente etapa, foi obtido um fator de purificação de 345,43 vezes e um rendimento de 0,023%.

Tabela 5: Etapas do processo de purificação da enzima β -1,3-glucanase de *D. pulvinata* crescido por 10 dias em meio contendo quitina como fonte de carbono

Etapas	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	5932	3170	0,53439	1	100
S-Sepharose	6,2	9,81	1,5823	2,96	0,31
DEAE-Sepharose	0,00408	0,75315	184,595	345,43	0,023

5. DISCUSSÃO

O fungo micopatogênico *D. pulvinata* foi descrito como eficiente antagonista do fitopatógeno *Microcyclus ulei*, causador do mau das folhas da seringueira (*H. brasiliensis*) (Tavares, 2001). Este trabalho foi realizado visando investigar as possíveis causas da relação de parasitismo entre esses fungos. Na literatura, a produção de enzimas hidrolíticas tais como proteases e glicosil hidrolases (β -glucanases e quitinase) são descritas como importantes para os mecanismos de ação no micoparasitismo, sobretudo aquelas com capacidade de hidrolisar componentes de parede celular (Ordenlich *et al.*, 1988; Leah *et al.*, 1991; Vazquez-Garcidueñas *et al.*, 1998; De La Cruz & Llobell, 1999; Kulminskaya *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2002; Hong & Meng, 2003; Montero *et al.*, 2005)

Desta forma é válido supor que exista uma correlação entre o antagonismo e a secreção enzimática pelo parasita, o que irá interferir na eficiência no controle biológico. Assim, estudos bioquímicos mais detalhados foi o principal objetivo deste trabalho, visando obter dados para a seleção de isolados com potencial para o controle biológico de *M. ulei* e estabelecer uma metodologia para purificação de uma enzima hidrolítica, relacionada ao parasitismo de *D. pulvinata*.

Um dos principais problemas da utilização de *D. pulvinata* no controle biológico de *M. ulei*, além do desconhecimento da capacidade de produção de enzimas micolíticas pelos diferentes isolados, é a baixa taxa de crescimento em meios de cultura sintéticos (Queiroz *et al.*, 2002). Foi verificado no decorrer deste trabalho que o sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 crescido com quitina como fonte de carbono, atingiu níveis elevados de atividade enzimática após 10 dias de crescimento (figura 8). A produção de quitinase só atingiu seu máximo, após sete dias de crescimento (figura 11).

Foi reportado que o fungo *Trichoderma viride* atingiu um máximo de produção de β -1,3-glucanase após 72 horas de crescimento (Kulminskaya *et al.*, 2001) O fungo micopatogênico *Stachybotrys elegans* atinge um máximo de produção

de quitinase em meio contendo quitina como fonte de carbono após três dias de crescimento. A produção de β -1,3-glucanase, em meio contendo glicose como fonte de carbono, atinge um máximo de atividade após dois dias de crescimento (Tweddell *et al.*, 1994). Enquanto a produção de uma β -1,3-glucanase de *Trichoderma hazianum* atingiu seu máximo após 96 horas de crescimento em meio contendo quitina como fonte de carbono (De La Cruz *et al.*, 1995).

A utilização de quitina como fonte de carbono no meio de cultura, como indutora de produção de enzimas micolíticas é amplamente difundida na literatura. Além dessa fonte de carbono, também foram utilizados, parede celular dos fungos parasitados, quitosana, β -1,3-glucanas e β -1,6 glucanas (Tweddell *et al.*, 1994; Vazquez-Garcidueñas *et al.*, 1998; Noronha *et al.*, 2000; Kulminskaya *et al.*, 2001). O fungo micoparásita *Verticillium biguttatum* é capaz de produzir quitinase e β -1,3-glucanase quando induzidos por quitina e laminarina respectivamente, no entanto, essa produção cessa quando o fungo é induzido pela presença de parede celular isolada de *R. solani* no meio de cultura como fonte de carbono (McQuilken & Gemmell, 2004).

Dos isolados utilizados neste estudo, apenas o isolado CEN 62 secretou β -1,3-glucanase no meio de cultura (figura 8) quando induzidos pela presença de quitina no meio de cultura, e nem o isolado CEN93 nem o CEN62 apresentaram atividade de quitinase no meio de cultura (figuras 5 e 8 respectivamente). Seria prematuro, no entanto, julgar que β -glucanases e quitinases não teriam um papel importante no mecanismo de parasitismo de *D. pulvinata* sobre *M. ulei*. É necessária a realização de mais experimentos, utilizando diferentes fontes de carbono, para verificar se, de fato, não há secreção dessas enzimas no meio de cultura.

Na maioria dos casos citados na literatura, as β -1,3-glucanases de origem fúngica são secretadas no meio de cultura (De La Cruz *et al.*, 1995; Vazquez-Garcidueñas *et al.*, 1998; Tweddell *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 2000; Kulminskaya *et al.*, 2001). Há, no entanto, casos de quitinases que podem ser encontradas na parede de fungos micoparásitas (McQuilken & Gemmell, 2004). As enzimas de ação micolíticas de plantas, ou seja, pertencentes à família 17 das glicosil hidrolases são,

em geral, enzimas adsorvidas na parede celular da própria planta (Thomas *et al.*, 2000).

Assim, por secretar β -1,3-glucanase no meio de cultura, o isolado CEN62 foi selecionado como fonte da enzima β -1,3-glucanase para o processo de purificação.

Foram realizados experimentos com a intenção de dissociar a enzima quitinase do micélio do isolado CEN 62. Desta forma, tentou-se solubilizar a fração insolúvel do micélio macerado utilizando diferentes concentrações do detergente Tween 80. Da mesma forma, foi tentada a lise desta fração micelial pela utilização do ultra-som, que também não foi capaz de dissociar a enzima do micélio. A perda de atividade pode ter sido causada por desnaturação da enzima causada por essas duas metodologias.

A purificação de β -1,3-glucanase de *Trichoderma viride* já foi reportada ocorrendo após a utilização de quatro processos cromatográficos (Kulminskaya *et al.*, 2001), enquanto a de *Penibacillus* sp. necessitou de três etapas de purificação (Hong & Meng, 2003). No presente trabalho foram utilizadas, até o momento, duas cromatografias de, uma de troca iônica, S-Sepharose, e outra de DEAE-Sepharose, resultando em elevado fator de purificação. A realização de outra etapa, no entanto, é necessária para a conclusão do processo de purificação da enzima β -1,3-glucanase.

Foram reportadas β -1,3-glucanase de massas moleculares próximas àquelas mostradas no perfil eletroforético de amostras da última etapa de purificação (cerca de 40 kDa, figura 24).. *Trichoderma harzianum* produz um enzima de 36 kDa (Noronha *et al.*, 2000), embora tenha sido descrito β -1,3-glucanases de vários tamanhos, não havendo assim um padrão (De La Cruz *et al.*, 1995).

6. Conclusão

Foi observado o perfil de produção de hidrolases (β -1,3-, β -1,3-1,4- e β -1,4-glucanase e quitinase) por dois isolados (CEN62 e CEN93) de *D. pulvinata* crescidos em meio líquido contendo quitina como fonte de carbono. De cada isolado foram analisadas três frações, o sobrenadante do meio de cultura, e as frações solúvel e insolúvel do micélio, separadas por maceração seguida de centrifugação.

Foi verificada a produção de atividade de β -1,3- e β -1,3-1,4-glucanases secretadas no sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 e uma atividade de β -1,3-glucanase, porém inferior a de CEN62, no mesmo sobrenadante de CEN93

A fração solúvel do micélio de CEN93 apresentou atividade de β -1,3- e β -1,3-1,4-glucanases e quitinase, enquanto de CEN62 apenas de β -1,3- e β -1,3-1,4-glucanases. A fração insolúvel do micélio de CEN93 apresentou atividade de β -1,3-glucanase e quitina. A fração insolúvel do micélio de CEN62 apresentou atividade de β -1,3- e β -1,3-1,4-glucanases e quitinase.

Nenhum dos isolados apresentou atividade celulolítica.

Não foi possível separar a atividade quitinolítica da fração insolúvel do micélio do isolado CEN62 após incubação com diferentes concentrações de detergente Tween80, ou com sonicação do micélio.

O sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 apresentou atividade de β -1,3-glucanase com temperatura ótima de 60°C e pH 5,5. A β -1,3-1,4-glucanase apresentou atividade com temperatura ótima de 50°C e pH 5,5. A β -1,3-glucanase presente no sobrenadante do meio de cultura apresentou termoestabilidade a 60°C, perdendo toda atividade a 70°C e 80°C em menos de 20 minutos.

O sobrenadante do meio de cultura do isolado CEN62 foi ultrafiltrado com uma membrana de reclusão de 30 kDa, e o concentrado foi cromatografado em uma

coluna de troca iônica (S-Sepharose, catiônica). Foi obtido um pico de atividade de β -1,3-glucanase (PS1) que apresentou seis espécies protéicas evidenciadas em SDS-PAGE. Foi feita nova cromatografia na mesma coluna coletando frações com menor volume de eluato por tubo e obteve-se um pico de atividade de β -1,3-glucanase (PS2). Esse pico de proteínas com atividade de β -1,3-glucanase foi analisado em SDS-PAGE e apresentou quatro espécies protéicas.

O eluato de PS1 foi cromatografado em uma coluna de DEAE-Sepharose (aniônica) e foi obtido um pico de atividade de β -1,3-glucanase (PD1), que apresentou três espécies protéicas com cerca de 40kDa em SDS-PAGE

7. PERSPECTIVAS

-Verificar o perfil de produção de β -glucanases e quitinases a partir de meios de cultura contendo outras fontes de carbono, como parede celular do fungo *M. ulei*, β -glucanas, quitosana, N-acetil-glicosamina.

-Finalização do processo de purificação da enzima β -1,3-glucanase.

-Caracterização bioquímica e cinética da enzima purificada

-Realização de ensaios de análise da ação da enzima purificada sobre o crescimento de *Microcyclus ulei*.

8. BIBLIOGRAFIA

Adams, P. B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases Annual Review of Phytopathology, v.28, p.59-72. 1990.

Arruda, J. J. D. A. &Pilletti, N. Toda a história. São Paulo: Editora Ática. 1997. 408 p.

Bastos, C. N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. Fitopatologia Brasileira, v.21, p.50-54. 1996.

Belanger, R. R., Dufour, N., Caron, J. &Benhamou, N. Chronological Events Associated with the Antagonistic Properties of *Trichoderma-Harzianum* against *Botrytis-Cinerea* - Indirect Evidence for Sequential Role of Antibiosis and Parasitism. Biocontrol Science and Technology, v.5, n.1, p.41-53. 1995.

Bernardes, M. S., Veiga, A. S. &Fonseca Filho, H. Mercado brasileiro de borracha. Piracicaba: ESALQ / USP / FEALQ. 1990

Blum, H., Beier, H. &Gross, H. J. Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels. Electrophoresis, v.8, n.2, Feb, p.93-99. 1987.

Bowles, D. J. Defense-related proteins in higher plants. Annu Rev Biochem, v.59, p.873-907. 1990.

Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1-2, p.248-254. 1976.

Chee, K. H. Assessing Susceptibility of Hevea Clones to *Microcyclus-Ulei*. *Annals of Applied Biology*, v.84, n.2, p.135-145. 1976a.

Chee, K. H. Factors Affecting Discharge, Germination and Viability of Spores of *Microcyclus-Ulei*. *Transactions of the British Mycological Society*, v.66, n.Jun, p.499-504. 1976b.

Chee, K. H. South-American Leaf-Blight of *Hevea-Brasiliensis* - Spore Dispersal of *Microcyclus-Ulei*. *Annals of Applied Biology*, v.84, n.2, p.147-152. 1976c.

Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. & Vad, K. Plant chitinases. *Plant J*, v.3, n.1, Jan, p.31-40. 1993.

Cordero, M. J., Raventos, D. & San Segundo, B. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant J*, v.6, n.2, Aug, p.141-50. 1994.

Costa, R. B. D., Gonçalves, P. D. S., Odalia-Rímolia, A. & Arrudaa, E. J. D. Melhoramento e conservação genética aplicados ao Desenvolvimento Local – o caso da

seringueira (*Hevea sp*). Revista Internacional de Desenvolvimento Local, v.1, n.2. 2001.

De Boer, W., Gunnewiek, P. J. A. K., Lafeber, P., Janse, J. D., Spit, B. E. & Woldendorp, J. W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. Soil Biology & Biochemistry, v.30, n.2, Feb, p.193-203. 1998.

De La Cruz, J. & Llobell, A. Purification and properties of a basic endo-beta-1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry, v.265, n.1, Oct, p.145-151. 1999.

De Marco, J. L., Lima, L. H. C., De Sousa, M. V. & Félix, 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 & Biotechnology, v.16, p.383-386. 2000.

Dean, W. A luta pela borracha no Brasil, em estudo de

história ecológica. São Paulo: Nobel. 1989. 286 p.

Filho, A. B. & Kimati, H. A importância das doenças das plantas. In: A. B. Filho, H. Kimati, et al (Ed.). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Ceres, v.1, 1995. A importância das doenças das plantas, p.919

Gasparotto, L., Ferreira, F. A., Lima, M. I. P. M., Pereira, J. C. R. & Santos, A. F. *Enfermidades da seringueira no Brasil*. Manaus: Embrapa - CPAA, v.3. 1990. 169 p. (Circular técnica)

Gasparotto, L., Zambolim, L., Maffia, L.A., Ribeiro Do Vale, F.X., Junqueira, N.T.V. Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção por *Microcyclus ulei* (P.henn.) V.arx em seringueira (*Hevea* spp.) *Fitopatologia Brasileira*, v.14, n.1, p.38-41. 1989.

Goncalves, P. D., Cardoso, M. & Ortolani, A. A. Origin, Variability and Domestication of *Hevea* - a Review. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.25, n.2, Feb, p.135-156. 1990.

Gonçalves, P. D. S. *Melhoramento genético da seringueira*. Campinas: IAC. 1995. 42 p. (Circular Técnica)

Gooday, G. W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*, v.1, n.2-3, p.177-190. 1990.

Graham, L. S. & Sticklen, M. B. Plant Chitinases. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, v.72, n.8, Aug, p.1057-1083. 1994.

Henrissat, B. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochemical Journal*, v.280, Dec 1, p.309-316. 1991.

Holliday, P. Dispersal of Conidia of *Dothidella Ulei* from *Hevea Brasiliensis*. *Annals of Applied Biology*, v.63, n.3, p.435-&. 1969.

Holliday, P. South american leaf blight. *Phytopathological papers*, v.12, p.31. 1970.

Hong, T. Y., Cheng, C. W., Huang, J. W. & Meng, M. S. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Streptomyces siوياensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-beta-glucan. *Microbiology-Sgm*, v.148, Apr, p.1151-1159. 2002.

Hong, T. Y. & Meng, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp isolated from garden soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.61, n.5-6, Jun, p.472-478. 2003.

Kulminskaya, A. A., Thomsen, K. K., Shabalin, K. A., Sidorenko, I. A., Eneyskaya, E. V., Savel'ev, A. N. & Neustroev, K. N. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-beta-glucanase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry*, v.268, n.23, Dec, p.6123-6131. 2001.

Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, v.227, n.5259, p.680-&. 1970.

Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I. & Mundy, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem*, v.266, n.3, Jan 25, p.1564-73. 1991.

Lima, L. H. C., De Marco, J. L., Ulhoa, C. J. & Felix, C. R. Synthesis of a *Trichoderma* chitinase which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *Folia Microbiologica*, v.44, n.1, p.45-49. 1999.

Lima, L. H. C., Ulhoa, C. J., Fernandes, A. P. & Felix, C. R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *Journal of General and Applied Microbiology*, v.43, n.1, Feb, p.31,37. 1997.

Loguercio-Leite, C. & Esposito, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: Educ's (Ed.). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educ's, 2004. Fungos: estrutura e ultra-estrutura

Mauch, F., Hadwiger, L. A. & Boller, T. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue .1. Purification and Characterization of 2 Chitinases and 2 Beta-1,3-Glucanases Differentially Regulated during Development and in Response to Fungal Infection. *Plant Physiology*, v.87, n.2, Jun, p.325-333. 1988.

McQuilcken, M. P., Gemmell J. Enzyme production by the mycoparasite *Verticillium biguttatum* against *Rhizoctonia solani*. *Mycopathologia* v.157, p.201–205, 2004.

Mello, C. M., Santos, M. F., Gangana, F. & Kososki, R. Isolados de *Dicyma pulvinata* obtidos em um levantamento realizado em seringais brasileiros.: Embrapa, v.81. 2003. 3 p. (Comunicado Técnico)

Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p.426-428. 1959.

Mitchell, J. K., Smith, D. H. & Taber, R. A. Potential for Biological-Control of *Cercosporidium-Peronospora* Leafspot of Peanuts by *Dicyma-Pulvinata*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, v.65, n.11, Nov, p.2263-2269. 1987.

Mitchell, R. & Alexander, M. Mycolytic Phenomenon and Biological Control of *Fusarium* in Soil. *Nature*, v.190, n.477, p.109-&. 1961.

Molano, J., Duran, A. & Cabib, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal Biochem*, v.83, n.2, Dec, p.648-56. 1977.

Montero, M., Sanz, L., Rey, M., Monte, E. & Llobell, A. BGN16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *Febs Journal*, v.272, n.13, Jul, p.3441,3448. 2005.

Noronha, E. F., Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A. P. & Ulhoa, C. J. Regulation of 36-kDa beta-1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Fems Microbiology Letters*, v.188, n.1, Jul 1, p.19-22. 2000.

Ordentlich, A., Elad, Y. & Chet, I. The Role of Chitinase of *Serratia-Marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium-Rolfii*. *Phytopathology*, v.78, n.1, Jan, p.84-88. 1988.

Pereira, A. V. & Pereira, E. B. C. Cultura da seringueira no cerrado. Planaltina, DF: Embrapa Cerrado. 2001. 59 p.

Peresse, M., Picar, D.L.E. *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. *Mycopathologia*, v.71, p.23-30. 1980.

Queiroz, P. R., M., L. W. N., C., M. R. A., C., L. L. H. & M., M. S. C. Métodos para indução e análise de enzimas micolíticas secretadas por *Dicyma pulvinata*.: Embrapa, v.17. 2002. 6 p. (Circular Técnica)

Rozeboom, H. J., Budiani, A., Beintema, J. J. & Dijkstra, B. W. Crystallization of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *J Mol Biol*, v.212, n.3, Apr 5, p.441,3. 1990.

Shivas, R. G., Triglone, T. & Petty, S. First record of *Cercospora leucaenae* on *Leucaena leucocephala* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, v.25, n.1, p.24-25. 1996.

Sivan, A. & Chet, I. Cell-Wall Composition of *Fusarium-Oxysporum*. *Soil Biology & Biochemistry*, v.21, n.6, p.869-871. 1989.

Taber, R. A., Pettit, R. E., Mcgee, R. & Smith, D. H. Potential for Biological-Control of *Cercosporidium* Leafspot of Peanuts by *Hansfordia*. *Phytopathology*, v.71, n.2, p.260-260. 1981.

Tavares, E. T. Variabilidade genética de isolados do micoparasita *Dicyma pulvinata* obtidos em lesões provocadas por *M. ulei* nos seringais brasileiros. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, 2001. 67 p.

Thomas, B. R., Romero, G. O., Nevins, D. J. & Rodriguez, R. L. New perspectives on the endo-beta-glucanases of glycosyl hydrolase Family 17. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.27, n.2, Apr 12, p.139-144. 2000.

Tirilly, Y., Lambert, F. & Thouvenot, D. Bioproduction of [C-14] Deoxyphomenone, a Fungistatic Metabolite of the Hyperparasite *Dicyma-Pulvinata*. *Phytochemistry*, v.30, n.12, p.3963-3965. 1991.

Trindade, D. R. & Furtado, E. L. Doenças da seringueira. In: H. Kimati (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Agranômica Ceres, 1997. Doenças da seringueira

Tweddell, R. J., Jabajihare, S. H. & Charest, P. M. Production of Chitinases and Beta-1,3-Glucanases by *Stachybotrys Elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia-Solani*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.2, Feb, p.489-495. 1994.

Vad, K., Deneergaard, E., Madrizordenana, K., Mikkelsen, J. D. & Collinge, D. B. Accumulation of Defense-Related Transcripts and Cloning of a Chitinase Messenger-Rna from Pea Leaves (*Pisum-Sativum* L) Inoculated with *Ascochyta-Pisi* Lib. *Plant Science*, v.92, n.1, p.69-79. 1993.

Vazquez-Garciduenas, S., Leal-Morales, C. A. & Herrera-Estrella, A. Analysis of the beta-1,3-glycanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.4, Apr, p.1442-1446. 1998.

Wessels, J. G. H. The Steady-State Growth Theory for Apical Wall Extension in Fungi. *Phytoparasitica*, v.16, n.2, p.180-180. 1988.

Wessels, J. G. H. Wall Growth, Protein Excretion and Morphogenesis in Fungi. *New Phytologist*, v.123, n.3, Mar, p.397-413. 1993.

Adams, P. B. The potential of mycoparasits for biological control of plant diseases *Annual Review of Phytophatology*, v.28, p.59-72. 1990.

Arruda, J. J. D. A. & Pilletti, N. *Toda a história*. São Paulo: Editora Ática. 1997. 408 p.

Bastos, C. N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.50-54. 1996.

- Belanger, R. R., Dufour, N., Caron, J. & Benhamou, N. Chronological Events Associated with the Antagonistic Properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* - Indirect Evidence for Sequential Role of Antibiosis and Parasitism. Biocontrol Science and Technology, v.5, n.1, p.41-53. 1995.
- Bernardes, M. S., Veiga, A. S. & Fonseca Filho, H. Mercado brasileiro de borracha. Piracicaba: ESALQ / USP / FEALQ. 1990
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels. Electrophoresis, v.8, n.2, Feb, p.93-99. 1987.
- Bowles, D. J. Defense-related proteins in higher plants. Annu Rev Biochem, v.59, p.873-907. 1990.
- Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, v.72, n.1-2, p.248-254. 1976.
- Chee, K. H. Assessing Susceptibility of Hevea Clones to *Microcyclus-ulei*. Annals of Applied Biology, v.84, n.2, p.135-145. 1976a.
- Chee, K. H. Factors Affecting Discharge, Germination and Viability of Spores of *Microcyclus-ulei*. Transactions of the British Mycological Society, v.66, n.Jun, p.499-504. 1976b.
- Chee, K. H. South-American Leaf-Blight of *Hevea brasiliensis* - Spore Dispersal of *Microcyclus-ulei*. Annals of Applied Biology, v.84, n.2, p.147-152. 1976c.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. & Vad, K. Plant chitinases. Plant J, v.3, n.1, Jan, p.31-40. 1993.
- Cordero, M. J., Raventos, D. & San Segundo, B. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. Plant J, v.6, n.2, Aug, p.141-50. 1994.
- Costa, R. B. D., Gonçalves, P. D. S., Odalia-Rímolia, A. & Arrudaa, E. J. D. Melhoramento e conservação genética aplicados ao Desenvolvimento Local – o caso da seringueira (*Hevea sp.*). Revista Internacional de Desenvolvimento Local, v.1, n.2. 2001.
- De Boer, W., Gunnewiek, P. J. A. K., Lafeber, P., Janse, J. D., Spit, B. E. & Woldendorp, J. W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. Soil Biology & Biochemistry, v.30, n.2, Feb, p.193-203. 1998.
- De La Cruz, J. & Llobell, A. Purification and properties of a basic endo-beta-1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry, v.265, n.1, Oct, p.145-151. 1999.

De Marco, J. L., Lima, L. H. C., De Sousa, M. V. & Félix, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis perniciosus*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.16, p.383-386. 2000.

Dean, W. A luta pela borracha no Brasil, em estudo de história ecológica. São Paulo: Nobel. 1989. 286 p.

Filho, A. B. & Kimati, H. A importância das doenças das plantas. In: A. B. Filho, H. Kimati, *et al* (Ed.). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Ceres, v.1, 1995. A importância das doenças das plantas, p.919

Gasparotto, L., Ferreira, F. A., Lima, M. I. P. M., Pereira, J. C. R. & Santos, A. F. Enfermidades da seringueira no Brasil. Manaus: Embrapa - CPAA, v.3. 1990. 169 p. (Circular técnica)

Gasparotto, L., Zambolim, L., Maffia, L.A., Ribeiro Do Vale, F.X., Junqueira, N.T.V. Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção por *Microcyclus ulei* (P.henn.) V. arx em seringueira (*Hevea spp.*) Fitopatologia Brasileira, v.14, n.1, p.38-41. 1989.

Goncalves, P. D., Cardoso, M. & Ortolani, A. A. Origin, Variability and Domestication of Hevea - a Review. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v.25, n.2, Feb, p.135-156. 1990.

Gonçalves, P. D. S. Melhoramento genético da seringueira. Campinas: IAC. 1995. 42 p. (Circular Técnica)

Gooday, G. W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. Biodegradation, v.1, n.2-3, p.177-190. 1990.

Graham, L. S. & Sticklen, M. B. Plant Chitinases. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique, v.72, n.8, Aug, p.1057-1083. 1994.

Henrissat, B. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. Biochemical Journal, v.280, Dec 1, p.309-316. 1991.

Holliday, P. Dispersal of Conidia of Dothidella Ulei from Hevea Brasiliensis. Annals of Applied Biology, v.63, n.3, p.435-&. 1969.

Holliday, P. South american leaf blight. Phytopathological papers, v.12, p.31. 1970.

Hong, T. Y., Cheng, C. W., Huang, J. W. & Meng, M. S. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-beta-glucan. Microbiology-Sgm, v.148, Apr, p.1151-1159. 2002.

Hong, T. Y. & Meng, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp isolated from garden soil. Applied Microbiology and Biotechnology, v.61, n.5-6, Jun, p.472-478. 2003.

Kulminskaya, A. A., Thomsen, K. K., Shabalin, K. A., Sidorenko, I. A., Eneyskaya, E. V., Savel'ev, A. N. & Neustroev, K. N. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-beta-glucanase from *Trichoderma viride*. European Journal of Biochemistry, v.268, n.23, Dec, p.6123-6131. 2001.

Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature, v.227, n.5259, p.680-&. 1970.

Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I. & Mundy, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. J Biol Chem, v.266, n.3, Jan 25, p.1564-73. 1991.

Lima, L. H. C., De Marco, J. L., Ulhoa, C. J. & Felix, C. R. Synthesis of a *Trichoderma* chitinase which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. Folia Microbiologica, v.44, n.1, p.45-49. 1999.

Lima, L. H. C., Ulhoa, C. J., Fernandes, A. P. & Felix, C. R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. Journal of General and Applied Microbiology, v.43, n.1, Feb, p.31-37. 1997.

Loguercio-Leite, C. & Esposito, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: Educ's (Ed.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educ's, 2004. Fungos: estrutura e ultra-estrutura

Mauch, F., Hadwiger, L. A. & Boller, T. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue .1. Purification and Characterization of 2 Chitinases and 2 Beta-1,3-Glucanases Differentially Regulated during Development and in Response to Fungal Infection. Plant Physiology, v.87, n.2, Jun, p.325-333. 1988.

Mello, C. M., Santos, M. F., Gangana, F. & Kososki, R. Isolados de *Dicyma pulvinata* obtidos em um levantamento realizado em seringais brasileiros.: Embrapa, v.81. 2003. 3 p. (Comunicado Técnico)

Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, v.31, n.3, p.426-428. 1959.

Mitchell, J. K., Smith, D. H. & Taber, R. A. Potential for Biological-Control of *Cercosporidium-Peronospora* Leafspot of Peanuts by *Dicyma-Pulvinata*. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique, v.65, n.11, Nov, p.2263-2269. 1987.

Mitchell, R. & Alexander, M. Mycolytic Phenomenon and Biological Control of *Fusarium* in Soil. Nature, v.190, n.477, p.109-&. 1961.

Molano, J., Duran, A. & Cabib, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. Anal Biochem, v.83, n.2, Dec, p.648-56. 1977.

Montero, M., Sanz, L., Rey, M., Monte, E. & Llobell, A. BGN16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. Febs Journal, v.272, n.13, Jul, p.3441-3448. 2005.

Noronha, E. F., Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A. P. & Ulhoa, C. J. Regulation of 36-kDa beta-1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. Fems Microbiology Letters, v.188, n.1, Jul 1, p.19-22. 2000.

Ordentlich, A., Elad, Y. & Chet, I. The Role of Chitinase of *Serratia-Marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium-Rolfii*. Phytopathology, v.78, n.1, Jan, p.84-88. 1988.

Pereira, A. V. & Pereira, E. B. C. Cultura da seringueira no cerrado. Planaltina, DF: Embrapa Cerrado. 2001. 59 p.

Peresse, M., Picar, D.L.E. *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. Mycopathologia, v.71, p.23-30. 1980.

Queiroz, P. R., M., L. W. N., C., M. R. A., C., L. L. H. & M., M. S. C. Métodos para indução e análise de enzimas micolíticas secretadas por *Dicyma pulvinata*: Embrapa, v.17. 2002. 6 p. (Circular Técnica)

Rozeboom, H. J., Budiani, A., Beintema, J. J. & Dijkstra, B. W. Crystallization of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. J Mol Biol, v.212, n.3, Apr 5, p.441-3. 1990.

Shivas, R. G., Triglone, T. & Petty, S. First record of *Cercospora leucaenae* on *Leucaena leucocephala* in Australia. Australasian Plant Pathology, v.25, n.1, p.24-25. 1996.

Sivan, A. & Chet, I. Cell-Wall Composition of *Fusarium-Oxysporum*. Soil Biology & Biochemistry, v.21, n.6, p.869-871. 1989.

Taber, R. A., Pettit, R. E., Mcgee, R. & Smith, D. H. Potential for Biological-Control of *Cercosporidium* Leafspot of Peanuts by *Hansfordia*. Phytopathology, v.71, n.2, p.260-260. 1981.

Tavares, E. T. Variabilidade genética de isolados do micoparasita *Dicyma pulvinata* obtidos em lesões provocadas por *Microcyclus ulei* nos seringais brasileiros. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, 2001. 67 p.

Thomas, B. R., Romero, G. O., Nevins, D. J. & Rodriguez, R. L. New perspectives on the endo-beta-glucanases of glycosyl hydrolase Family 17. International Journal of Biological Macromolecules, v.27, n.2, Apr 12, p.139-144. 2000.

Tirilly, Y., Lambert, F. & Thouvenot, D. Bioproduction of [C-14] Deoxyphomenone, a Fungistatic Metabolite of the Hyperparasite *Dicyma-Pulvinata*. Phytochemistry, v.30, n.12, p.3963-3965. 1991.

Trindade, D. R. &Furtado, E. L. Doenças da seringueira. In: H. Kimati (Ed.). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1997. Doenças da seringueira

Tweddell, R. J., Jabajihare, S. H. &Charest, P. M. Production of Chitinases and Beta-1,3-Glucanases by *Stachybotrys Elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia-Solani*. Applied and Environmental Microbiology, v.60, n.2, Feb, p.489-495. 1994.

Vad, K., Deneergaard, E., Madrizordenana, K., Mikkelsen, J. D. &Collinge, D. B. Accumulation of Defense-Related Transcripts and Cloning of a Chitinase Messenger-Rna from Pea Leaves (*Pisum-Sativum L*) Inoculated with *Ascochyta-Pisi Lib*. Plant Science, v.92, n.1, p.69-79. 1993.

Vazquez-Garciduenas, S., Leal-Morales, C. A. &Herrera-Estrella, A. Analysis of the beta-1,3-glucoanalytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, v.64, n.4, Apr, p.1442-1446. 1998.

Wessels, J. G. H. The Steady-State Growth Theory for Apical Wall Extension in Fungi. Phytoparasitica, v.16, n.2, p.180-180. 1988.

Wessels, J. G. H. Wall Growth, Protein Excretion and Morphogenesis in Fungi. New Phytologist, v.123, n.3, Mar, p.397-413. 1993.