ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DO FUNGO *Crysoporthe puriensis*

Iêda Alana Leite de Sousa[1], Maria Alves Ferreira[2], Géssica Mylena Santana Rêgo[3], Gabrielle Avelar Silva[4], Aline Ferreira Barros[5], Mara Elisa Soares de Oliveira[6]

[1]Universidade Federal do Pará, e-mail: ialanaleites@gmail.com;
[2]Universidade Federal de Lavras, e-mail: mariaferreira@ufla.br;
[3]Universidade Federal de Lavras, e-mail: gehrego@gmail.com;
[4]Universidade Federal de Lavras, e-mail: gabi.as92@hotmail.com;
[5]Associação dos Produtores de Sementes do Mato Grosso, e-mail: afbarros2004@yahoo.com.br;
[6]Universidade Federal do Tocantins, e-mail: maraelisa@uft.edu.br.

Palavras-chave: cancro, Cryphonectriaceae, enzimas, Myrtales

Introdução

A doença do cancro em espécies arbóreas tem como agentes etiológicos oito espécies do gênero *Chrysoporthe* sp. Os principais hospedeiros afetados pelo cancro pertencem a ordem botânica Myrtales [1,2]. *Chrysoporthe puriensis* é a espécie mais recentemente descrita do gênero *Chrysoporthe* sp., com sua ocorrência associada ao cancro em *Tibouchina granulosa*, *T. heteromalla* e *T. candolleana* nos estados da Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A espécie foi detectada em ambientes de florestas nativas, arborização urbana e áreas de reflorestamento. Apesar de ainda não ocorrer em espécies de eucalipto, o teste de patogenicidade realizado em mudas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* demonstrou que o fungo pode ser altamente patogênico a espécie [2].

A patogenicidade desse fitopatógeno pode ser relacionada a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, uma vez que estão estreitamente relacionadas ao processo de infecção e colonização do hospedeiro por patógeno fúngicos [3]. Essas, por sua vez, são responsáveis pela digestão de polímeros e obtenção de carboidratos para o crescimento e reprodução do patógeno, quebrando barreiras da parede celular permitindo a penetração e colonização do tecido vegetal pelo patógeno [4].

Algumas enzimas são objetos de investigação em fitopatógenos tais como celulase, fenoloxidases, lipase, pectinase e amilase, por influenciarem diretamente na patogenicidade dos fungos. Além disso, as enzimas produzidas por fungo são constantemente empregadas em pesquisas biotecnológicas para otimização de bioprocessos, pois podem suprir um dos principais gargalos em processos de biodegradação: a eficiência limitada e custos das enzimas comerciais utilizadas [5, 6]. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento, a identificação e a caracterização enzimática de isolados de *Chrysoporthe puriensis* obtidos de árvores sintomáticas com a doença do cancro de *Tibouchina* spp.

Material e Métodos

Os isolados foram obtidos de árvores sintomáticas de *T. granulosa* e *T. heteromalla* em áreas de florestas nativas, por meio da coleta de casca e galhos realizada nos municípios de

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151526?lang=pt-br

Lavras, Silveirânia e Carrancas-MG. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Patologia Florestal – UFLA. O isolamento foi realizado por meio de culturas monospóricas, em que esporos únicos germinados foram transferidos para placas contendo meio YEMA (extrato de levedura a 0,2%, extrato de malte a 2%, ágar a 2%) e incubados a 28 °C/7 dias. Em seguida, as culturas puras foram preservadas em micro tubo a seco e com água destilada. A identificação dos isolados ocorreu por meio de técnicas moleculares, com o DNA genômico total extraído pelo método CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromid®, Sigma, USA). A amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para as regiões nucleares do espaçador interno transcrito (ITS) no gene 5,8 S conservado do DNA ribossômico (*primers* ITS1 e ITS4), e a região do gene de β-tubulina (*primers* Bt1a / Bt1b e Bt2a / Bt2b). Os produtos amplificados foram encaminhados para purificação e sequenciamento a Empresa Macrogen, Korea. Múltiplos alinhamentos foram realizados utilizando a interface online do MAFFT e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o software PAUP *, versão 4.0 e MrBayes v. 3.2.1, pelos métodos de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana, respectivamente. Sequências de *Amphilogia gyrosa* foram utilizadas como *outgroup* nas análises.

Para caracterização enzimática foram selecionados oito isolados representativos e identificados como *C. puriensis* conforme análise filogenética (THS12, THS32, THS41, THS42, THS43, THS53, THS61, THS92, THS101) para avaliar a produção qualitativa de lipase, fenoloxidase, amilase, pectinase e celulase. Assim, metodologias descritas por Davidson et al. [7], Hankin e Anagnostakis [8] e Nogueira e Calvacanti [9], foram realizadas para detecção das enzimas. Como controle foram transferidos apenas discos de meio malte a 2% (MEA) para os meios de cultura específicos. Este ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições e cada placa representou uma unidade amostral. A determinação da atividade enzimática (Pz) foi calculada em razão do diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia acrescido da zona de precipitação e/ou halo (dcp), onde Pz = dc / dcp. A atividade enzimática (Pz) foi considerada negativa quando Pz = 1, positiva para 0,64 = Pz < 1 e fortemente positiva quando Pz < 0,64 [8].

Resultados e Discussão

Foram obtidos 50 isolados das amostras de *T. granulosa* e *T. heteromalla*. As sequências obtidas foram alinhadas com 32 sequências adicionais de *Chrysoporthe* spp., 68 sequências de diferentes gêneros de Cryphonectriaceae. Os produtos de PCR das regiões utilizadas apresentaram aproximadamente 474 pb para ITS e 695 pb para BT1 e BT2. As árvores geradas para as duas regiões gênicas mostraram topologias semelhantes em ambas as análises e com ramos bem suportados. As espécies do gênero *Chrysoporthe* agruparam-se em nove clados bem

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151526?lang=pt-br

suportados. A árvore concatenada das regiões mostrou que os 50 isolados de *Tibouchina* sp. obtidos neste estudo foram agrupados com espécies tipo de *C. puriensis*, com altos valores de bootstrap (98%) e alta probabilidade posterior (1.0). Observou-se a formação de dois sub-clados para os isolados de *C. puriensis*, devido a presença de sítios de nucleotídeos únicos polimórficos nas regiões de ITS e BT1. Isso pode ser explicado pela alta variabilidade genética e um alto fluxo de genes entre os respectivos isolados *C. puriensis*, como demonstrado pelo estudo de populações realizado por Oliveira et al. [2].

O ensaio enzimático mostrou que os oito isolados testados produziram as enzimas lipase e celulase. A produção das enzimas amilase e pectinase foram ausentes, mas ocorreu crescimento micelial dos isolados nestes meios, embora insuficiente para formação de halo de degradação. A detecção de fenoloxidases ocorreu em dois isolados (THS41 e TH42), demonstrado pelo halo de oxidação de coloração marrom. Os isolados THS42 e THS61 tiveram atividade enzimática (Pz) fortemente positivo (++) para enzima lipase - índices enzimáticos (IE) abaixo de 0,64. Para celusase, os isolados apresentaram IE entre 0,7 e 0,9 (Tabela 5). Isolados representativos do sub-clado 1 (THS41 e THS4) tiveram Pz positiva para três enzimas testadas – lipase, celulase e fenoloxidase, enquanto, isolados do sub-clado 2 (THS32, THS61 e THS92) apresentaram Pz positivo para apenas duas enzimas – lipase e celulase.

Tabela 5 – Atividade enzimática de isolados de *C. puriensis* de *Tibouchina* spp.

Isolados	Lipase		Celulase		Fenoloxidase		Amilase		Pectinase	
	IE	PZ	IE	PZ	IE	PZ	IE	PZ	IE	PZ
THS12	0,71	+	0,84	+	1	-	1	-	1	-
THS32	0,71	+	0,91	+	1	-	1	-	1	-
THS41	0,90	+	0,75	+	0,75	+	1	-	1	-
THS42	0,42	+ +	0,75	+	0,63	++	1	-	1	-
THS53	0,66	+	0,75	+	1	-	1	-	1	-
THS61	0,57	+ +	0,76	+	1	-	1	-	1	-
THS92	0,75	+	0,84	+	1	-	1	-	1	-
THS101	0,69	+	0,81	+	1	-	1	-	1	-

Legenda: IE = índice enzimático; PZ= atividade enzimática. Fonte: Do autor (2020).

A produção das enzimas celulase, fenoloxidases e lipase foi comprovada para isolados de *C. puriensis*. Essas enzimas, auxiliam, respectivamente, nas seguintes ações do fitopatógeno no hospedeiro suscetível: degradação dos componentes da parede celular [10]; decomposição dos componentes da lignina, que impede a entrada e colonização de fitopatógenos no hospedeiro [11]; e na adesão de esporos a superfície do hospedeiro e a degradação de fosfolipídios.

A produção dessas enzimas pode ser associada a definição de isolados mais ou menos agressivo do patógeno, além de desempenhar um importante papel na relação patógeno-hospedeiro [4]. Além disso, a produção enzimática por isolados de *C. puriensis* poderá auxiliar em futuras investigações biotecnológicas e na otimização de bioprocessos, tendo em vista que

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151526?lang=pt-br

já foi confirmado por um outro estudo o grande potencial de extrato enzimático produzido por *C. cubensis* em aplicações biotecnológicas no processo de sacarificação do bagaço de cana para produção de etanol [6].

Conclusão

A identificação dessas espécies por meio da análise filogenética através de comparações de sequências de DNA mostrou-se eficiente. Há diferença na produção enzimática de isolados da mesma espécie de *C. puriensis*, podendo indicar isolados mais ou menos agressivos do patógeno, devendo mais bem investigado em testes de patogenicidade. E a produção positiva de celulase, fenoloxidases e lipase por esses isolados poderá auxiliar em futuras investigações biotecnológicas e otimização de bioprocessos.

Referências

[1] SOARES, T.P.F. et al. Canker disease caused by *Chrysoporthe doradensis* and *C. cubensis* on *Eucalyptus* sp. and *Tibouchina* spp. in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.43, p.314–322, 2018.

[2] OLIVEIRA, M.E.S. et al. *Chrysoporthe puriensis* sp. nov. from *Tibouchina* spp. in Brazil: an emergin threat to *Eucalyptus*. **Australian Plant Pathology**, v.50, p.29-40, 2021.

[3] FALKOSKI, D.L. et al. *Chrysoporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v.130, p. 296–305, 2013.

[4] MAITAN ALFENAS, G. P.; ALFENAS, R. F.; GUIMARÃES, V. M. Phytopathogenic fungi: useful tools to degrade plant biomass for bioethanol production. **Mod Concep Dev Agrono - MCDA.000604**, v.5, n.1, p.499-501, 2019.

[5] JØRGENSEN, H.; PINELO, M. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 1, p. 150-167, 2017.

[6] MARTINS, M.P. et al. Recycling of *Chrysoporthe cubensis* enzymes to overcome the adsorption in lignin and to improve sugarcane bagasse saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, p. 105854, 2020.

[7] DAVIDSON, R.W.; CAMPBELL, W.A.; BLAISDELL, D.J. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of agricultural research,** v.43, p.638-685, 1938.

[8] HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p. 597-607, 1975.

[9] NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

[10] SOHAIL, M. et al. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v.25, n.6, p.437-441, 2009.

[11] GILL, P.K.; ARORA, D.S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**., v. 30, p. 28-33, 2003.

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151526?lang=pt-br