

C. Ciências Biológicas - 2. Biologia - 3. Biologia Geral

INTERAÇÃO DE FRAÇÕES PROTEICAS DE *Chromobacterium violaceum* COM ESPOROS DE *Colletotrichum* sp. isolado de guaranazeiro

Paula Cristina da Silva Angelo ¹

Adriana Sotero-Martins ²

Antonia Maria Ramos Franco ³

José Clério Rezende Pereira ¹

José Cristino Araújo ¹

Jorge Luis López Lozano ⁴

1. Pesquisadores, Embrapa Amazônia Ocidental
2. Pesquisadora, Fundação Oswaldo Cruz
3. Pesquisadora, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
4. Pesquisador, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

INTRODUÇÃO:

Chromobacterium violaceum é uma bactéria de vida livre presente em ecossistemas tropicais e subtropicais, que é abundante nas margens do Rio Negro, e tem sido estudada no Brasil nos últimos trinta anos. O genoma completo da bactéria foi sequenciado e anotado e as sequências estão disponíveis para consulta pública no GenBank (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003). Entre os produtos do metabolismo da *C. violaceum* que apresentam atividade anti-microbiológica (Duran & Menck, 2000; Matz *et al.*, 2004), estão a violaceína, que não é difusível, e quitinases, ambas expressas em resposta ao mesmo mecanismo de *quorum sensing* (Chernin *et al.*, 1998). A atividade de quitinases sobre o micélio de *Colletotrichum gloesporioides* foi demonstrada (Sandhya *et al.*, 2005). Além de violaceína e quitinases, podem existir outras proteínas e peptídeos expressos pela bactéria que apresentem atividade antifúngica. O objetivo deste trabalho foi testar extratos proteicos de *C. violaceum* fracionados por diferenças de solubilidade dos seus componentes quanto à atividade inibitória da protrusão de hifas de *Colletotrichum* sp. isolado de folhas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) com sintomas de antracnose, principal doença dos guaranazais no Amazonas.

METODOLOGIA:

Os esporos de *Colletotrichum* sp. foram fornecidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus/AM). O cultivo de *C. violaceum*, cepa ATCC12472, em meio M9 (meio mínimo, Sambrook *et al.*, 1989). A extração, que incluiu procedimento para eliminar a violaceína das amostras, e o fracionamento por solubilidade das proteínas (ptns) foram realizados nos laboratórios da FIOCRUZ. Foram testadas frações hidrofílicas, sendo: **A** . ptns intracelulares e **B** . ptns extracelulares, recolhidas do meio após o cultivo. Os tratamentos de interação com os esporos foram:

- T1: 300 mg de ptns da fração A, por 6 h
- T2: 1200 mg de ptns da fração A, por 6 h
- T4: 300 mg de ptns da fração B, por 6 h
- T5: 1200 mg de ptns da fração B, por 6 h
- T7: 400 mg de ptns da fração A, por 4 h
- T8: 1600 mg de ptns da fração A, por 4 h
- T10: 400 mg de ptns da fração B, por 4 h
- T11: 1600 mg de ptns da fração B, por 4 h

Os tratamentos **3**, **6**, **9** e **12** foram controles (esporos sem interação com ptns). A temperatura de 28 °C foi mantida durante a interação. A variável analisada foi a razão entre o número de esporos para os quais foi observada a protrusão de hifas, passadas duas, quatro ou seis horas de interação com as frações protéicas, dividido pelo número total de esporos contados por campo. A contagem dos esporos foi realizada ao microscópio, utilizando aumento de 40X e os campos de observação foram tomados como repetições. Para análise foi utilizado o teste Z para proporções (Fox *et al.*, 1985), a 5% de probabilidade.

RESULTADOS:

Não foi observada germinação de esporos nas primeiras duas horas, sob qualquer condição. A fração intracelular apresentou maior atividade de inibição de germinação dos esporos do que a fração extracelular. Da fração A (intracelular), 300 e 1200 g de proteínas, em interação por 6 h, diferiram significativamente e 1200 g foram mais efetivos do que 300 g quanto à inibição da germinação dos esporos de *Colletotrichum*. Uma vez que os resultados obtidos usando 400 g não diferiram dos obtidos com 1600 g, em interação por 4 h, é provável que a partir de 400 g o componente ativo desta fração proteica seja efetivo independente do tempo de reação. A atividade antagônica da fração B (extracelular) só diferiu do controle quando observada por 4 h de experimentação. Os 400 g das proteínas da fração B inibiram a germinação de uma proporção maior de esporos de *Colletotrichum* do que 1200 g durante um tempo maior (6 h) de interação. Uma hipótese para explicar estes resultados é que a atividade das proteínas presentes nesta fração reduziu-se ao longo do tempo de observação e perdeu-se na avaliação de 6 h. Não houve diferença entre as duas quantidades das proteínas da fração B utilizadas nos experimentos com duração de 6 h.

CONCLUSÃO:

Existem componentes/*especimens* proteicos capazes de inibir a germinação de esporos de *Colletotrichum* sp. isolado de plantas de guaranazeiro tanto entre as proteínas hidrofílicas intracelulares quanto extracelulares encontradas no meio M9 colonizado por *Chromobacterium violaceum*.

Agradecimentos: ao Técnico do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, Jeferson Chagas da Cruz, que realizou a contagem dos esporos.

Instituição de Fomento: FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas

Palavras-chave: guaraná, antracnose, Amazônia.