

ESTUDO DA DINÂMICA DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR E DAS ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE ESPÉCIES DE TRICHODERMA DURANTE O MICOPARASITISMO

Dynamics of cell wall polysaccharides and hydrolytic enzymes of Trichoderma species during mycoparasitism

Gerci Aprijo Ferreira

Universidade Estadual de Goiás - UEG
gercineito@outlook.com

Roberto Nascimento Silva

Universidade de São Paulo - USP
rsilva@fmrp.usp.br

Valdirene Neves Monteiro

Universidade Estadual de Goiás - UEG
valdirene.neves@ueg.br

Resumo: A parede celular do fungo é responsável pela proteção, forma e comunicação intracelular. Essas variedades funcionais, estão relacionadas à sua composição tendo como principais componentes glicanas e quitinas que podem ser variáveis de acordo com a espécie e gênero do fungo. O gênero *Trichoderma* está entre os mais estudados atualmente, devido a sua importância para a agricultura por ser efetivo contra patógenos de plantas. Neste estudo foram utilizados os isolados de *Trichoderma*, *Trichoderma harzianum* selvagem, *Trichoderma harzianum* mutante (Δ epl1), *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma reesei* e os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. O perfil de açúcares presentes na parede dos isolados de *Trichoderma* foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelando que estes apresentaram o mesmo perfil de glicose, oriunda de glucanas, e oligossacarídeos de quitobiose como pentacetil e diacetil bem como a N-acetilglicosamina presentes na estrutura de quitinas. Durante a interação com os fitopatógenos todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram elevação de glucanas e quitinas. A atividade de glucanases e quitinases na interação de isolados de *Trichoderma* com os fitopatógenos mostrou que, durante a interação com os fitopatógenos, os isolados de *Trichoderma* apresentaram respostas diferentes dessas enzimas e que *Trichoderma asperellum* foi o que apresentou melhor atividade das enzimas avaliadas. Este trabalho mostrou a dinâmica existente de glucanas, quitinas e das enzimas degradadoras da parede celular de fitopatógenos, glucanases e quitinases, e que, essas alterações estão intimamente relacionadas com a composição da parede celular de fitopatógenos definindo-os bons candidatos como agentes no biocontrole.

Palavras chaves: Composição da parede celular de *Trichoderma*. Enzimas degradadoras da parede celular. Micoparasitismo.

Abstract: The fungal cell wall is responsible for protection, shape, and intracellular communication. These functions are related to the cell wall composition, with the main components being glucans and chitins, which vary according to species and genus of the fungus. The genus *Trichoderma* is among the most studied because of its importance in agriculture for effective biological control of plant pathogens. Isolates of *T. harzianum* cepa selvagem, *T. harzianum* (Δ ep11) cepa com mutações, *T. asperellum*, and *T. reesei*, and the phytopathogens *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* were investigated. The profiles of sugars in the walls of the *Trichoderma* isolates were determined by high performance liquid chromatography, revealing that they all presented the same profile of glucose (derived from glucans), chitobiose oligosaccharides (such as pentacetyl and diacetyl), and the N-acetylglucosamine present in the structure of chitins. All *Trichoderma* isolates showed an increase in glucans and chitins during interaction with phytopathogens. The *Trichoderma* isolates differed in responses to glucanases and chitinases during interactions with phytopathogens, and *T. asperellum* showed the greatest activity of the evaluated enzymes. The dynamics of glucans and chitins, and glucanases and chitinases (the cell wall-degrading enzymes of phytopathogens) were revealed. The observed changes were closely related to the cell wall composition of the phytopathogens, confirming the *Trichoderma* isolates as good candidates for biocontrol agents.

Keywords: Composition of the wall of *Trichoderma* isolated. Cell wall degrading enzymes. Mycoparasitism.

INTRODUÇÃO

A parede celular dos fungos é constituída basicamente de polissacarídeos e proteínas sendo glicanas e quitinas os principais polissacarídeos. As glicanas (α -1,3-glicana, β -1,3- e β -1,6- glicanas) representam em torno de 50 a 60% e estudos mostram que em alguns fungos filamentosos, as glicanas são responsáveis por oferecer força e integridade mecânica a parede celular (BARTNICKI-GARCIA,1968;BOWMAN; FREE, 2006; FESEL; ZUCCARO, 2016; CURTO *et al.*, 2021). As quitinas (β - 1,4 –N-acetilglicosamina) constituem entre 10 a 20% na parede fúngica sendo encontradas em três formas diversas na parede celular fúngica: a quitina livre, a quitina ligada a β -1,3-glicana e a quitina ligada a β -1,6-glicana que consequentemente é ligada a mananas e também a β -1,3-glicana (ORLEAN, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2018). As proteínas encontradas na parede são ligadas a moléculas de manose, formando assim as manoproteínas em torno de pouco mais de 30% (RUIZ-HERRERA; ORTIZ-CASTELLANOS, 2019).

Os fungos do gênero *Trichoderma*, foram reconhecidos como potenciais agentes de controle biológico inicialmente por Weindling quando relatou a ação micoparásita de *Trichoderma* contra os fitopatógenos do gênero *Rhizoctonia* e *Sclerotinia* (DRUZHININA *et al.*, 2010; GRUBERE; SEIDL-SEIBOTH, 2012; POVEDA, 2021). Espécies de *Trichoderma* compreendem um grupo de fungos filamentosos saprófitos de solo, encontrados sobre matéria orgânica em decomposição e na rizosfera de algumas plantas e são caracterizados por utilizar

uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio (DRUZHININA *et al.*, 2010).

O controle biológico de fitopatógenos por espécies de *Trichoderma* pode ocorrer através de vários mecanismos, dentre os quais os mais relevantes são: micoparasitismo, antibiose, indução de resistência, competição (SILVA *et al.*, 2019; MUKHERJEE *et al.*, 2022).

A secreção de enzimas relacionadas ao processo de micoparasitismo variam de acordo com a composição da parede dos fitopatógenos que em geral é composta por β -1,3-glicanas, quitinas e algumas proteínas (MUKHERJEE *et al.*, 2022; KUMAR; KHURANA, 2021). As β -1,3-glicanases são glicosilhidrolases (GH) pertencentes a família CAZymes (<http://www.cazy.org>) as quais catalisam a hidrólise da cadeia de β -1,3-glicana, polímero constituído de resíduos de D-glicose ligados em uma configuração β -1,3 e são divididas em Exo- β -1,3-glicana e Endo- β -1,3-glicana (SHARMA *et al.*, 2022). O sistema quitinolítico consiste de quitinases e N- acetilglicosaminidases onde atuam clivando as ligações glicosídicas da quitina, que é um polissacarídeo linear, formado por unidades de N-acetilglicosamina unidas por ligações do tipo β -1-4 também fazem parte das glicosil-hidrolases pertencentes a família CAZymes listadas como família GH 18 e 19 e poucas inseridas com GH 23 e 48 (ZAPPARATA *et al.*, 2021).

No presente estudo, foi avaliada a dinâmica de glicanas e quitinas da parede celular de isolados de *Trichoderma*, bem como as enzimas hidrolíticas, glicanases e quitinases, durante o micoparasitismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados e condições de cultivo dos fungos. Os fungos *Trichoderma harzianum* selvagem, *T. harzianum* mutante (Δ ep11), *T. asperellum* e *T. reesei* foram obtidos da coleção do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás (UFG) e do laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade de São Paulo (USP). Os fungos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (Fo), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) e *Rhizoctonia solani* (Rs) foram obtidos da coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Arroz e Feijão (Santo Antônio - Goiás). Os fungos foram mantidos em repiques periódicos em meio de cultura ágar batata (BDA), e desenvolvimento em estufa incubadora do tipo BOD, a 28°C por 7 dias e armazenados a 4°C.

Interação dos isolados de Trichoderma com os fitopatógenos. A interação entre os isolados de *Trichoderma* e os fitopatógenos foi realizada adicionando discos de 5 mm das culturas em lados opostos em placas de petri contendo meio BDA recoberto com membranas estéreis de celofane como descrito por Bell *et al.* (1992). Assim, as placas continham de um lado da margem da placa de petri um dos isolados de *Trichoderma* e na outra margem da placa de petri um dos isolados dos fitopatógenos. As placas de petri foram incubadas em estufa do tipo BOD a 28°C e após o encontro das duas culturas, o que ocorreu em aproximadamente 72 horas, o micélio de cada um dos isolados de *Trichoderma* foi coletado por raspagem e armazenado em ultra-freezer -80° C para análises posteriores. Placas de petri contendo apenas os isolados (controle) foram obtidos com adição de um disco de 5 mm de cada isolado em uma placa de petri contendo meio BDA recoberto com papel celofane. As culturas foram incubadas em estufa BOD por 7 dias a 28°C. Após o crescimento dos fungos, os micélios foram coletados por raspagem e armazenados em *Ultra-freezer* -80°C para análises posteriores.

Extração de polissacarídeos da parede celular e quantificação de açúcares. A extração do polissacarídeo foi realizada conforme descrito anteriormente por François (2006) utilizando 10 mg de massa seca da parede celular. Após a extração, 1 ml da preparação final foi concentrado por liofilização e utilizado para quantificação de açúcar via HPLC.

Os níveis de açúcar foram medidos usando um sistema da série Young Lin YL9100 (Young Lin, Anyang, Coréia) equipado com um detector de índice de refração (RI) da série YL9170 a 40°C. As amostras foram carregadas em coluna REZEX ROA (Phenomenex, EUA) (300 × 7,8 mm) a 85°C e eluídas com ácido sulfúrico 0,05 M a uma taxa de fluxo de 1,5 mL/min. Os níveis de quitina e β-1,3-glucana foram estimados com base nos teores de N-acetil-glucosamina e glicose, respectivamente.

Os teores de N-acetil-glucosamina e glicose também foram determinados por métodos espectrofotométricos. Para determinação colorimétrica de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o método Morgan-Elson (2003), foi adaptado para leitores de microplacas. Para isso, a reação foi desenvolvida com a adição de 10 µl de cada uma das amostras e, em seguida, foi adicionado tetraborato de potássio pH 9,2 e incubado a 100°C por 10 minutos.

As amostras foram resfriadas a 4°C por 1 minuto e adicionadas 1X DMAB e incubadas a 37°C por 20 minutos. As amostras foram lidas em um leitor de microplacas “Expert Plus” BIOCHROM® a 585nm. As concentrações de N-acetil-D-glucosamina foram obtidas a partir de uma curva padrão construída com concentrações de N-acetil-D-glucosamina entre 0,5 e 1

mg/mL. A glicose foi determinada de acordo com as instruções do kit Glucox (Doles TM), utilizando a glicose como padrão. O teste foi realizado em um espectrofotômetro GEHAKA®.

Atividades enzimáticas. As atividades enzimáticas da quitinase, β -1,3-glucanase e liquenase (endo-1,3,1,4- β -Glucanase) foram determinadas pelo método colorimétrico usando quitina coloidal, laminarina e liquena como substratos. As quantidades de açúcar redutor liberadas foram determinadas a 550 nm seguindo o método DNS usando N-acetilglucosamina e glicose como padrões. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ mol de açúcares redutores por minuto (ALMEIDA *et al.*, 2007). A atividade da N-acetilglicosaminidase foi determinada pelo método colorimétrico usando PNP-NAG (Sigma-AldrichCo., Wisconsin, EUA) como substrato (ALMEIDA *et al.*, 2007). A atividade enzimática foi medida monitorando a taxa de formação de p-nitrofenol a partir do substrato. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

Análises Estatísticas. O procedimento estatístico dos dados foi efetuado por meio de análise de variância (ANOVA) e do teste de *Tukey*, a fim de determinar diferenças significativas entre as médias, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), com auxílio do *software Prisma GraphPadPrism 7.04 (Graphpad Software)*.

As correlações foram avaliadas através do coeficiente de correlação de *Pearson* utilizando o *software R v2.14.1*. A significância do teste ($\alpha = 0,05$) foi ajustado seguindo a correção de *Bonferroni* (RICE, 1989).

RESULTADOS

A fim de estudar a dinâmica da parede celular dos isolados de *Trichoderma* e as enzimas envolvidas no micoparasitismo três espécies de *Trichoderma*, *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. reesei* e um mutante de *T. harzianum* (Δ epl1), que possui uma deleção da proteína Epl1 a qual pertence à família das cerato-plataninas. Os isolados de *Trichoderma* foram confrontados em placa de petri com os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinea sclerotiorum*.

O perfil de açúcares que compõe as estruturas de glicanas e quitinas presentes nas paredes celulares dos isolados de *Trichoderma* antes e depois da interação com os fitopatógenos (Figura 1) foi analisado utilizando a metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE). Observa-se nesta abordagem que a parede celular dos isolados de *Trichoderma* apresentaram o mesmo perfil de glicose, oriunda de glucanas, e oligossacarídeos de quitobiose como pentacetil e diacetil bem como a N-acetilglucosamina presentes na estrutura de quitinas e que, esses açúcares se encontram elevados na interação dos isolados de *Trichoderma* e os fitopatógenos (Figuras 1B, 1C, 1D).

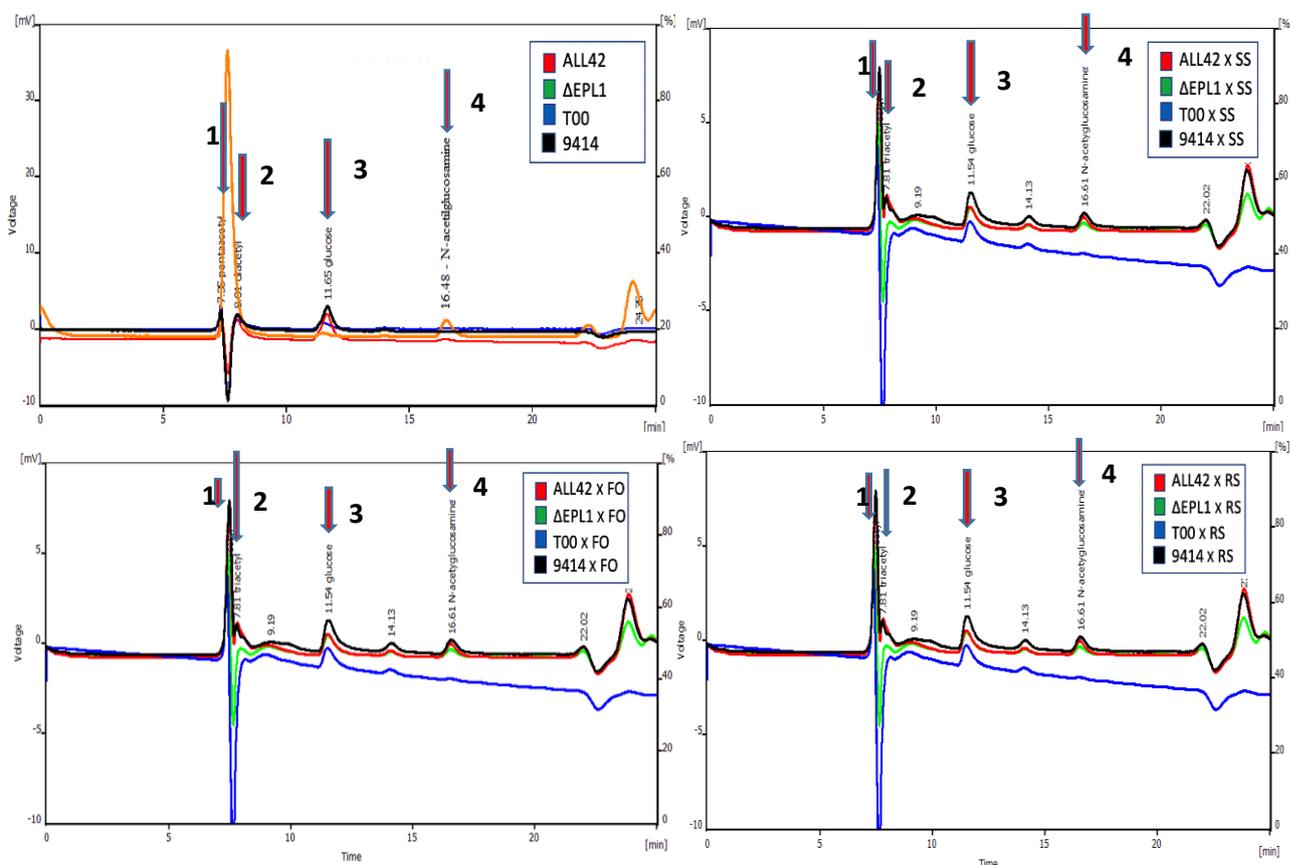


Figura 1- Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência. Os níveis de quitina e glucana foram estimados com base nos teores de Pentacetil (1), Diacetil (2) e N-acetil-glucosamina (4) para quitina e glicose (3), para glucana. Níveis de quitina e glucana da parede celular de espécies de *Trichoderma* sem interação com fitopatógenos (A). Níveis de quitina e glucana da parede celular de *T. harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ Epl1), *T. Asperellum* (T00) e *T. ressei* (9414). (B) Níveis de quitina e glucana da parede celular de espécies de *Trichoderma* em contraste com o patógeno *Rhizoctonia solani* (RS). (C) Níveis de quitina e glucana da parede celular de espécies de *Trichoderma* em contraste com o patógeno *Sclerotinea sclerotiorum* (SS). (D) Níveis de quitina e glucana da parede celular de espécies de *Trichoderma* em contraste com o patógeno *Fusarium oxysporum*

Todos os isolados de *Trichoderma* utilizados neste estudo elevaram seus conteúdos de glucanas e quitinas sendo as glucanas mais elevadas nessa situação do que quitinas (Figura 2). Porém, observa-se que quitinas estão elevadas em todas as interações dos isolados de *Trichoderma* e o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Curiosamente, *T. asperellum* apresentou mais

elevação nos seus conteúdos de quitina quando confrontado com o fitopatógeno *F. oxysporum* seguido do mutante de *T. harzianum*(Δ ep11).

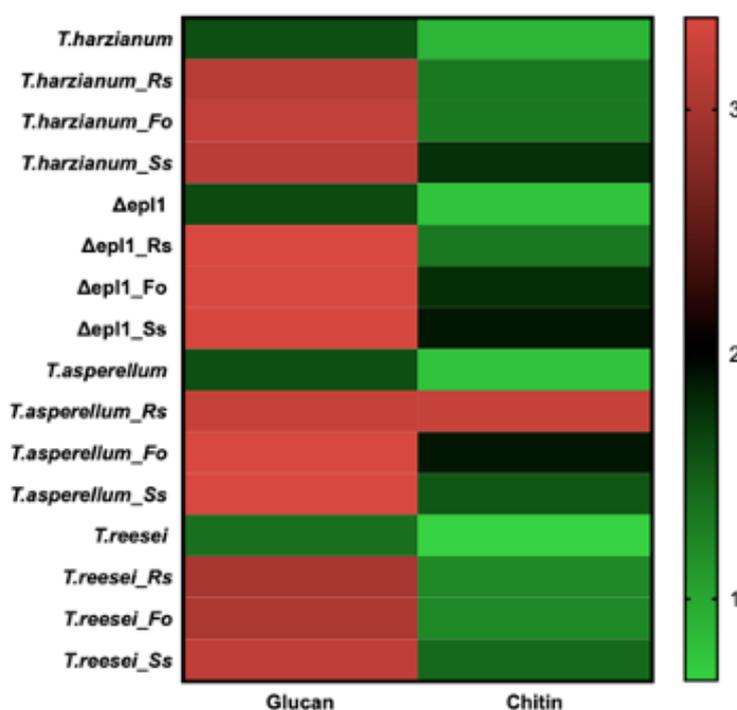


Figura 2. Heatmap do conteúdo de glucana e quitina na parede dos isolados de *Trichoderma*. *T. harzianum*, mutante de *T. harzianum* (Δ ep11), *T. asperellum* e *T. reesei* nos confrontos com os fitopatógenos *Rhizoctonia solani* (Rs), *Fusarium oxysporum* (Fo) e *Sclerotinea sclerotiorum* (Ss).

Vários estudos do micoparasitismo de espécies de *Trichoderma* abordam as enzimas glucanases e quitinases por serem aquelas mais relevantes nas estratégias de micoparasitismo de isolados de *Trichoderma*. Assim, nesse estudo foi analisada, a dinâmica de exo e endo β 1,3-glucanases, quitinases e β -N-acetylglucosaminidase (NAGase) na interação entre os isolados de *Trichoderma* e os fitopatógenos (Figura 3).

Entre os isolados, *Trichoderma asperellum* foi o que apresentou melhor desempenho entre glucanases e quitinases sobretudo, nas interações com os fitopatógenos *R. solani* e *S. sclerotiorum* (Figuras A, B e C) diferindo na interação entre *T.asperellum* e os fitopatógenos *F.oxysporum* e *S. sclerotiorum* onde a atividade de β -N-acetylglucosaminidase (NAGase), foi melhor (Figura D). Ainda a respeito da atividade dessa enzima pode-se observar que o mutante de *T. harzianum* apresentou boa atividade de NAGase nas interações com os fitopatógenos *R. solani* e *S. sclerotiorum* (Figura D).

Um fato interessante é que *T. reesei* apresenta muito baixa atividade de glucanases (Figuras A e B) porém, uma relativa atividade das enzimas do sistema quitinolítico (Figuras C e D).

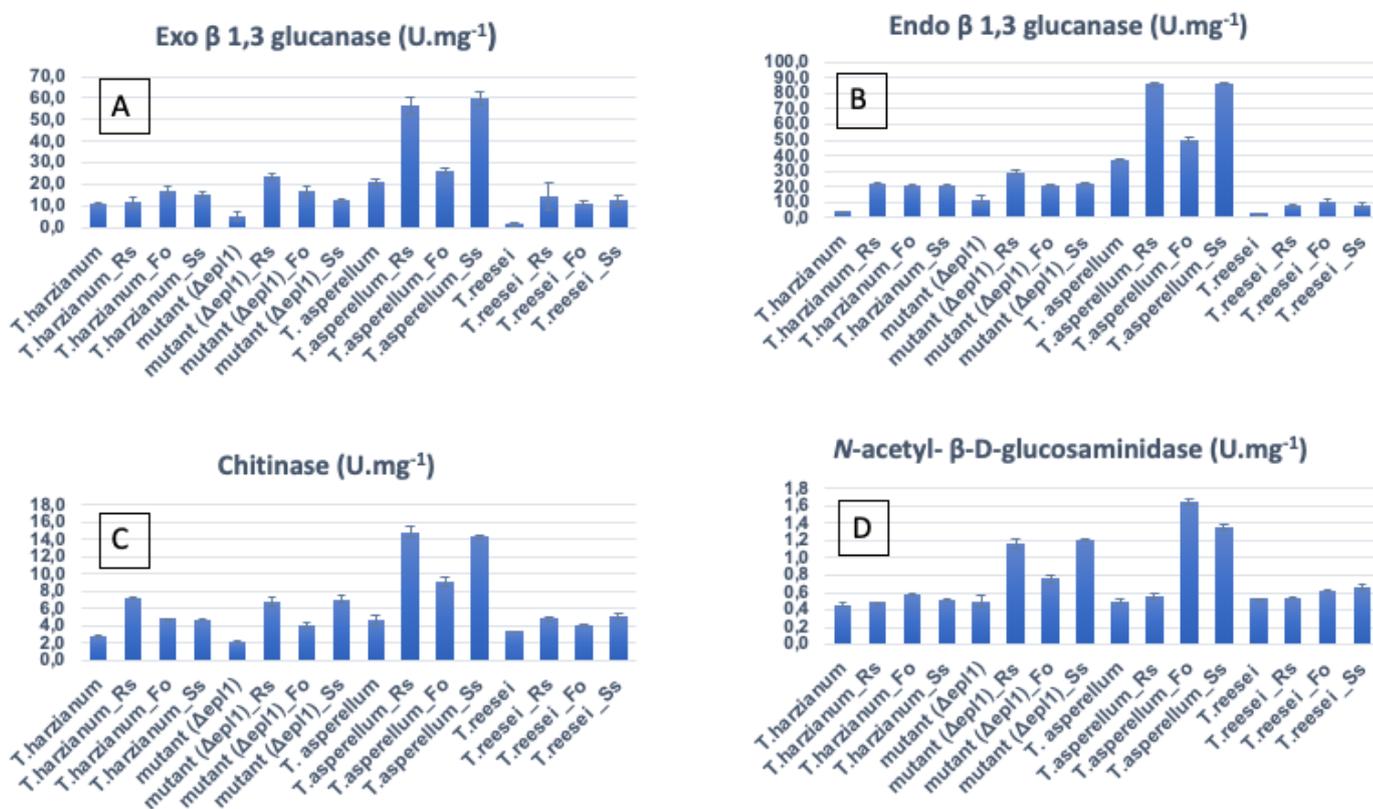


Figura 3. Atividade das enzimas no confronto de isolados de *Trichoderma* e os fitopatógenos. A) Exoβ-1,3 glucanase. B) Endo β-1,3 glucanase. C) Chitinase. D) N-acetyl-β -D-glucosaminidase (NAGase). Os confrontos foram: *Trichoderma harzianum* (Controle), *Trichoderma harzianum* e *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum* e *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum* e *Sclerotinea sclerotiorum*. Mutante de *Trichoderma harzianum* (Δep11) (Controle), mutante de *Trichoderma harzianum* (Δep11) e *Rhizoctonia solani*, mutante de *Trichoderma harzianum* (Δep11) e *Fusarium oxysporum*, mutante de *Trichoderma harzianum* (Δep11) e *Sclerotinea sclerotiorum*. *Trichoderma asperellum* (Controle), *Trichoderma asperellum* e *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma asperellum* e *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma asperellum* e *Sclerotinea sclerotiorum*. *Trichoderma reesei* (Controle), *Trichoderma reesei* e *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma reesei* e *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei* e *Sclerotinea sclerotiorum*.

Outro ponto de interesse nesse estudo foi a correlação entre os polissacarídeos da parede celular e as enzimas hidrolíticas (Tabela 1). Esta análise mostrou que houve correlação entre quitinases e glucanases e que, quitinases apresentaram correlação com a quitina e glucanas. Os polissacarídeos quitinas e glucanas apresentaram correlação. Não houve correlação entre glucanases e glucanas.

Tabela 1. Correlação entre enzimas hidrolíticas e os polissacarídeos da parede celular de isolados de *Trichoderma*. Resultados de *p-value* significativos estão representados em vermelho e resultados negativos representados em negrito.

	<i>Chitinase</i> <i>Person</i> <i>(r)</i>	<i>p-value</i>	<i>Glucan</i> <i>Person</i> <i>(r)</i>	<i>p-value</i>	<i>Exoβ-1,3</i> <i>glucanase</i> <i>Person (r)</i>	<i>p-value</i>	<i>Endo β-1,3</i> <i>glucanase</i> <i>Person (r)</i>	<i>p-value</i>
Chitin	0,62415	0,000141	0,74936	5,90E-08	0,37554	0,563123	0,36137	0,76677
Chitinase		0,596625	0,00050	0,66161	2,02E-05	0,64730	4,37E-05	
Exoβ-1,3 glucanase		0,383262	0,47321			0,98223	0	
Endo β- 1,3 glucanase		0,380135	0,50798					

DISCUSSÃO

Todos isolados de *Trichoderma* quando em confronto com os fitopatógenos apresentaram o mesmo padrão de açúcares (Figura 1) e elevação dos principais polissacarídeos da parede celular, glucanas e quitinas, onde glucanas apresentaram níveis mais elevados (Figura 2). O que leva a acreditar que espécies de *Trichoderma* se adaptam a condições adversas e que o conteúdo dos polissacarídeos presentes na parede celular pode ser alterado, porém, sua composição permanece inalterada (CANTU *et. al.*, 2009). Além disso, variações no conteúdo de glicanas e quitinas entre diferentes espécies de fungos parecem ser responsáveis pelas características físicas e químicas na parede celular onde a síntese de glucanas e quitinas é realizada na região apical pelas enzimas β-1,3-glucano sintase (GS) e quitina sintase (CHS), respectivamente (CURTO *et al.*, 2021). As β-1,3-glicanas possuem maior ação na parede fúngica atuando como moduladoras do sistema de defesa de fungos onde a presença de receptores de membranas, como a dectina-1 é capaz de interagir com as β-1,3-glicanas e desencadear uma resposta de defesa no organismo hospedeiro (ALMEIDA, *et al.*, 2007; CANTU *et.*, *al.*, 2009).

Importante ressaltar que a elevação dos níveis de glucanas e quitinas em *T.ressei* (9414), não está diretamente relacionada à função micoparásita pois, *T.ressei* é um fungo reconhecidamente envolvido na degradação da biomassa lignocelulósica e, dessa forma, a elevação do conteúdo de glucanas e quitinas observada, provavelmente possa estar relacionado ao estresse gerado durante o confronto com os fitopatógenos levando o fungo a se adaptar à

condições adversas, (POOSAPATI *et al.*, 2021;NICOLÁS *et al.*, 2014). Por outro lado, estudos realizados com o isolado *Trichoderma asperellum* mostraram uma forte ação micoparasita no combate aos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* esta ação pode estar fortemente ligada a composição de glicanas e quitina da parede celular desses fitopatógenos, onde acredita-se que a composição da parede celular dos fitopatógenos possa estar relacionada com a produção das enzimas glicanases e quitinases respectivamente por isolados de *Trichoderma*, sendo estas muito importantes no processo de micoparasitismo (MARCELLO *et al.*, 2008; KAPPEL *et al.*, 2020).

No processo de micoparasitismo, o principal objetivo é a liberação de enzimas que irão atuar na parede celular do fitopatógeno. Inicialmente *Trichoderma* libera endoquitinases constitutivas que liberarão oligômeros oriundos do hospedeiro antes mesmo do contato dos dois fungos. A presença desses oligômeros ativa uma cascata de sinalização via proteína G com a produção de enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs – *Cell wall degrading enzymes*) (DRUZHININA *et al.*, 2010). No contato entre os fungos ocorre o enovelamento de *Trichoderma* sobre a hifa do hospedeiro e com uma estrutura chamada de apressório, *Trichoderma* libera, enzimas hidrolíticas, glucanases e quitinases que promovem a dissolução da parede celular do fungo hospedeiro permitindo que *Trichoderma* acesse o conteúdo intracelular causando a morte do fungo hospedeiro (GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2019).

A constituição da parede celular de fitopatógenos determina a produção das enzimas hidrolíticas pelo agente de biocontrole. Diferentes espécies de fungos com paredes celulares de constituições diferentes podem determinar a secreção de enzimas diferentes quantitativamente e qualitativamente (MONTEIRO *et al.*, 2010; QUALHATO *et al.*, 2013; NAOUN *et al.*, 2018). Para avaliar essa questão, a dinâmica da atividade de glucanases e quitinases na interação de isolados de *Trichoderma* com os fitopatógenos mostrou que, durante a interação com os fitopatógenos, os isolados de *Trichoderma* apresentaram respostas diferentes dessas enzimas (Figura 3). Assim, *T.asperellum* foi o que apresentou melhor atividade das enzimas avaliadas sobretudo, nas interações com os fitopatógenos *R.solani* e *S. sclerotiorum* para glucanases e quitinases (Figuras 3A, 3B e 3C). A atividade de N-acetyl-β-D-glucosaminidase foi mais elevada entre *T.asperellum* e o mutante de *T. harzianum* (Δep11) (Figura 3D). Cada espécie de *Trichoderma* possui o seu próprio modo de ação para interagir com fitopatógenos apresentando atuações fracas, moderadas ou elevadas. O fungo *Trichoderma harzianum* é considerado um bom agente micoparasita, porém este é também descrito na literatura por apresentar um

relevante papel na promoção no crescimento de plantas (YEDIDIA *et al.*, 1999; KAMBLE *et al.*, 2021) o que pode explicar a baixa atividade das enzimas envolvidas no micoparasitismo desse isolado, quando comparado ao *T. asperellum*. A baixa atividade de endo e exoglucanases e quitinases pelo mutante de *T. harzianum* ($\Delta ep11$) pode ser explicada pela deleção promovida no gene que codifica a proteína Ep11 a qual está relacionada a estágios iniciais de desenvolvimento de fungos filamentosos ligada à parede celular e na indução da resposta de defesa, o que pode ter afetado o desempenho pelo fungo na secreção dessas enzimas (GOMES *et al.*, 2015). O mutante de *T. harzianum* ($\Delta ep11$) somente apresentou atividade elevada de NAGase na interação com os fitopatógenos *R.solani* e *S. sclerotiorum*. Provavelmente a deleção tenha perturbado a secreção de quitinase e o fungo na tentativa de contornar essa situação eleva a atividade de NAGase. *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) são essenciais para a indução de quitinases (BRUNNER, 2003). Quitinases de *Trichoderma* estão presentes antes do contato com o fitopatógeno, apresentando a função de liberar oligômeros da hifa do hospedeiro onde esse evento promove a dinâmica intracelular resultando no aumento da parede celular com a ativação das enzimas quitina sintase e glucanasintase no sentido de produzir glucanas e quitinas responsáveis pelos aspectos morfofisiológicos da parede celular de espécies de *Trichoderma* e na sequência a liberação de glucanases e quitinases com atuação na degradação da parede celular de fitopatógenos causando a autólise com consequente morte do hospedeiro (PLAZA *et al.*, 2020; INBAR; CHET, 1995). Assim, observa-se que entre os isolados de *Trichoderma* avaliados, *Trichoderma asperellum* apresentou melhor desempenho por apresentar dentre todos, conteúdos elevados de glicosil-hidrolases (GH) quando confrontado com os fitopatógenos, levando a crer que um sinergismo de glucanases e quitinases pode demonstrar uma capacidade elevada no micoparasitismo para essa espécie sendo reconhecidamente um forte candidato no controle biológico (LOPES *et al.*, 2012). A eficiência no micoparasitismo está muito relacionada com a espécie de *Trichoderma*, com a produção de enzimas e o sinergismo destas (HERRERA-ESTRELLA; CHET, 1998; HERNÁNDEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2014).

O gênero *Trichoderma* possui uma variedade de genes ligados a produção de Glicosil-hidrolases (GH) específicas, responsáveis por degradar quitina, quitosana e β -glucanas da parede celular de outros fungos e que se encontram em abundância no genoma de *Trichoderma* em comparação a outros fungos, o que torna este gênero bastante conhecido pela sua capacidade

de micoparasitismo e sua utilização como agente de biocontrole (POOSAPATI *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2022).

A análise de correlação (Tabela 1) entre os polissacarídeos, quitinas e glucanas, mostrou que houve correlação entre esses polissacarídeos. De fato, a correlação existente entre esses polissacarídeos mostra a íntima ligação entre glucanas e quitinas que se reúnem através da formação de ligações de hidrogênio intracadeias se reunindo em microfibrilas formando um arcabouço ao redor da célula que representa o componente estrutural da parede celular (GOW *et al.*, 2017).

Quitinases apresentaram correlação com quitinas e glucanas. Provavelmente isto se deve a íntima associação de quitinases com frações da parede celular presentes nos locais de ramificação das hifas com o envolvimento de sua atividade na remodelação da parede celular (ALCAZAR-FUOLI *et al.*, 2011).

Glucanas e glucanases não apresentaram correlação por que estas enzimas embora possam estar também comprometidas na morfogênese da parede celular, a não correlação das glucanases com glucanas indicam que estas estejam comprometidas com o micoparasitismo. Diferentes espécies de *Trichoderma* seguem padrões de indução de enzimas durante interação com fitopatógenos e, em geral, produzem baixos níveis de uma exoquitinase extracelular que se difunde e catalisa a liberação de oligômeros da parede celular do fungo alvo levando a indução da expressão de endoquitinases que também se difundem e iniciam o ataque com a atuação sinérgica de glucanases e quitinases (MUKHERJEE *et al.*, 2022) o que explica a correlação entre quitinases e glucanases observada neste trabalho.

Diante do exposto foi demonstrado que entre as espécies de *Trichoderma* existe uma dinâmica própria no conteúdo dos componentes principais da parede celular bem como das principais enzimas degradadoras da parede celular (CWDEs) de fitopatógenos e que essas alterações estão intimamente relacionadas com a composição da parede celular de fitopatógenos definindo-os bons candidatos para uso como agentes de biocontrole. Os componentes da parede celular são dinâmicos, podendo sofrer alterações de acordo com fatores externos, como condições ambientais, forma de cultivo e principalmente ao estresse gerado do contato de *Trichoderma* com fitopatógenos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. **O fogo e a biodiversidade: os dois lados de uma mesma moeda.** Disponível em: <<https://darwinianas.com/2017/03/28/o-fogo-e-a-biodiversidade-os-dois-lados-de-uma-mesma-moeda/#:~:text=Nesse%20ambiente%2C%20est%C3%A1%20claro%20que,nutrientes%2C%20na%20forma%20de%20cinzas.>>. Acesso em: 16 de julho de 2022.

CARTER, M. C.; FOSTER, C. D. **Prescribed burning and productivity in southern pine forests: a review.** *Forest Ecology Management, Madison*, v. 191, n. 1-3, p. 93-109, apr. 2004.

CASSOL, E. A. et al. **Erosividade das chuvas em Taquari, RS, determinada pelo índice EI30, no período de 1963 a 1999.** In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DE SOLO E ÁGUA, 15., 2004, Santa Maria. Anais. Santa Maria: SBCS, 2004.

CHUVIECO, E.; GIGLIO, L.; JUSTICE, C. **Global characterization of fire activity: toward defining fire regimes from Earth observation data.** *Global Change Biology*. v. 14, n. 7, p. 1488-1502, 2008.

COSTA, M. R. G. F. **Uso do fogo em pastagens naturais.** UFC. Fortaleza, Ceará. 2009.

GIOVANNINI, G.; LUCCHESI, S. Modifications induced in soil physico-chemical parameters by experimental fires at different intensities. **Soil Science**, [s.l.], v. 162, n. 7, p.479-486, 1997. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). DOI: 10.1097/00010694-199707000-00003.

FRANÇA, H., RAMOS NETO, M. B.; SETZER, A. **O fogo no Parque Nacional das Emas.** Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2007.

FREITAS, D.A. **Estabilidade da agregação em áreas ardidas e não ardidas no nordeste de Portugal: um importante indicador da qualidade do solo.** Instituto Politécnico de Bragança – IPB. Bragança, 2018.

IBAMA. **Plano de Manejo do Parque Nacional das Emas.** Brasília, DF: [s.n.], 2004.

KEMPER, W. D.; ROSEN, A. **Aggregate stability and size distribution.** (Cap.17). pp. 425-442. In: Klute, A. (ed.). *Methods of soil analysis (part 1). Physical and mineralogical methods.* SSSA Book Series n.5. Madison, Wisconsin USA., 1986. 1188pp.

KUTIEL, P.; INBAR, M. **Fire impacts on soil nutrients and soil erosion in a Mediterranean pine forest plantation.** *Catena*, [s.l.], v. 20, n. 1-2, p.129-139, fev. 1993. Elsevier BV. DOI: 10.1016/0341-8162(93)90033-1.

NEARY, D. G.; KLOPATEK, C. C.; DEBANO, L. F.; FFOLLIOTTI, P. F. **Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis.** *Forest Ecology and Management*, v. 122, n. 1-2, p. 51-71, 1999.

OLIVEIRA, M. E. de; SILVA, I. L. da. **Efeitos do fogo sobre o solo.** *Floresta e Ambiente*, [s.l.], p.142-145, 1994.

PINEDA, N.; MONTANYÀ, J.; VAN. **Related to wildfire ignitions in Catalonia.** DER VELDE, O. A. Characteristics of lightning Atmospheric research. v. 135, p. 380-387, 2014.

RAMOS NETO, M. B. **O Parque Nacional das Emas (GO) e o fogo:** implicações para a conservação biológica. São Paulo. 159 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2000.

REDIN, M.; SANTOS, G.D.F.D.; MIGUEL, P.; DENEGA, G.L.; LUPATINI, M.; DONEDA, A.; SOUZA, E.L.D. **Impactos da queima sobre atributos químicos, físicos e biológicos do solo.** *Ciência Florestal*, Santa Maria, v.21, n.2, p.381-392, abr.-mai., 2011.

SANTOS, J. F.; SOARES, R. V.; BATISTA, A. C. **Perfil dos incêndios florestais no Brasil em áreas protegidas no período de 1998 a 2002.** *Revista Floresta*, v. 36, n. 1, 2012.

SILVA, L.G.D. **Comportamento e efeito do fogo sobre os ecossistemas do bioma cerrado: modelos baseados em processos.** Brasília-DF, mar., 2018.

SWANSON, F. J. **Fire and Geomorphic Processes.** In: MOONEY, H. A. et al (Org.). *Fire regimes and ecosystem properties.* Honolulu: General Technical Report Wo-26, 1981. p. 401-420.

THOMAZ, E.L. **Influência da temperatura no diâmetro e na estabilidade de agregados em chernossolo, Saskatchewan, Canadá.** *Asociacion Argentina Ciencia del Suelo.* 2011.

SOBRE A AUTORA E OS AUTORES

GERCI APRIJO FERREIRA

Graduado em Farmácia pela Faculdade Montes Belos. Especialista em Farmacologia Clínica pela Faculdade Montes Belos e Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, com ênfase em bioquímica de microrganismos. Gestor da Assistência Farmacêutica do município de São João da Paraúna – GO.

ROBERTO NASCIMENTO SILVA

Graduado em Farmácia pela Universidade Federal de Goiás. Mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás. Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade de Brasília. Professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

VALDIRENE NEVES MONTEIRO

Graduada em Farmácia Bioquímica pelo Instituto Unificado de Ensino Superior Objetivo. Mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás. Doutora em Biologia pela Universidade Federal de Goiás. Professora da Universidade Estadual de Goiás.