

ANGÉLICA DE SOUZA GOUVEIA

**ANÁLISE DE EXTRATOS FÚNGICOS RELACIONADOS AO CONTROLE  
BIOLÓGICO DE FITONEMATOIDES E À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO  
VEGETAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

G719a  
2018 Gouveia, Angélica de Souza, 1992-  
Análise de extratos fúngicos relacionados ao controle  
biológico de fitonematoides e à promoção de crescimento  
vegetal / Angélica de Souza Gouveia. – Viçosa, MG, 2018.  
ix, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Humberto de Queiroz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Fitonematoides - Controle biológico. 2. *Pochonia  
chlamydosporia*. 3. Plantas - Crescimento. 4. Auxinas.  
5. Fosfatos - Solubilização. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

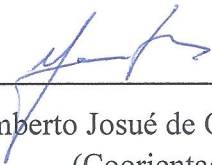
CDD 22 ed. 632.96

ANGÉLICA DE SOUZA GOUVEIA

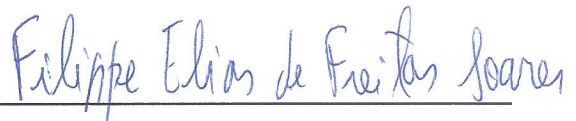
**ANÁLISE DE EXTRATOS FÚNGICOS RELACIONADOS AO CONTROLE  
BIOLÓGICO DE FITONEMATÓIDES E À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO  
VEGETAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

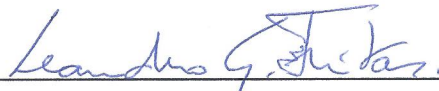
APROVADA: 23 de fevereiro de 2018



Humberto Josué de Oliveira Ramos  
(Coorientador)



Filipe Elias de Freitas Soares  
(Coorientador)



Leandro Grassi de Freitas



José Humberto de Queiroz  
(Orientador)

*Aos meus tios Fernando e Adelaide, por todo incentivo e amor  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica, professores e funcionários, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado. Em especial ao Eduardo, pela paciência e por sua eficiência em resolver os problemas burocráticos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento do projeto de pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto de pesquisa;

Ao Prof. Dr. José Humberto de Queiroz, pela amizade, orientação e confiança;

Ao Prof. Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos, pelo apoio, orientação, disponibilidade e pelas sugestões na correção desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Leandro Grassi de Freitas, pela confiança, conselhos, oportunidade de trabalhar com *Pochonia chlamydosporia* e com fitonematoides e pelas sugestões na correção desse trabalho;

À Profa. Dr. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, por permitir a análise de ácidos orgânicos no Laboratório de Análise de Vitaminas e à Solange Mara Bigonha, pela execução da análise;

À Thalita Suelen Avelar Monteiro, pela disponibilidade infinita, amizade, incentivo sempre, orientação, sugestões na correção desse trabalho e por todos os ensinamentos;

Ao Camilo Elber Vital, pela disponibilidade sempre que solicitado, paciência e conselhos;

Ao Filipe Elias Soares de Freitas, pela amizade e pelas sugestões na correção desse trabalho;

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa por fornecer as instalações para a condução dos experimentos. E ao apoio financeiro das seguintes agências: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI);

À Stoller, pelo auxílio nas análises de auxina.

Às amigas do Laboratório de Metabolismo e Fermentação, Vânia, Bruna, Natália, Sílvia, Samara e Gabriela pela amizade e colaborações. Em especial, a Paula pela ajuda com os experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, Paulo, Huarlen, Raul, Luciana, Cássia e Fernanda pelo apoio e o bom convívio;

Aos técnicos, Jean, João e Carol, pela paciência e auxílio nos experimentos;

Aos meus pais, Cida e Antenor, e ao meu irmão, Francisco, pelo amor, incentivo e compreensão;

Aos meus familiares que sempre depositaram confiança e contribuíram para que eu alcançasse mais essa etapa;

Às minhas amigas, Mônica, Lívia, Mariana, Isadora e Patrícia pela paciência e apoio;

Ao Túlio, pela paciência, companheirismo, carinho e os ótimos conselhos de experimento;

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	8
CAPÍTULO 1: Purificação parcial de compostos com atividade nematicida em condições de fermentação sólida.....	17
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Cultivo de <i>Monacrosporium thaumasium</i> em meio sólido .....	22
2.2 Obtenção dos extratos.....	22
2.3 Obtenção de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	23
2.4 Ensaio de atividade nematicida com os extratos brutos .....	23
2.5 Fracionamento dos extratos .....	23
2.5.1 Ultrafiltração e ensaio de atividade nematicida.....	24
2.5.2 Precipitação com acetona e ensaio de atividade nematicida .....	25
2.5.3 Precipitação em meio básico e ensaio de atividade nematicida .....	25
2.5.4 Extração em fase sólida (SPE-Fase Normal) e ensaio de atividade nematicida.....	25
2.6 Teste colorimétrico para compostos fenólicos .....	26
2.7 Análise por espectrometria de massas da fração com atividade nematicida .....	26
2.8 Teste de atividade nematicida com compostos puros.....	27
2.9 Confirmação do efeito nematicida dos extratos .....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28

3.1 Avaliação do efeito nematicida a partir do extrato bruto de <i>Monacrosporium thaumasium</i> .....	28
3.2 Análise por espectrometria de massas da fração com atividade nematicida referente ao extrato bruto de <i>Monacrosporium. thaumasium</i> .....	30
3.3 Avaliação do efeito nematicida de compostos puros.....	32
3.4 Avaliação do efeito nematicida de extrato de farelo de trigo .....	33
3.5 Análise por espectrometria de massas da fração com atividade nematicida referente ao extrato do farelo de trigo .....	35
3.6 Confirmação do efeito nematicida dos extratos .....	40
4. CONCLUSÕES .....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
CAPÍTULO 2: Análise de extratos extracelulares de <i>Pochonia chlamydosporia</i> , agente de controle biológico de fitonematoides e promotor de crescimento vegetal.....	48
RESUMO .....	49
ABSTRACT .....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Avaliação do extrato de <i>Pochonia chlamydosporia</i> PC-10.....	52
2.2 Isolados fúngicos .....	53
2.3 Produção de protease por isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio sólido .....	53
2.4 Proteômica.....	54
2.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	54
2.4.2 Tripsinização de proteínas .....	54
2.4.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas .....	55
2.5 Solubilização de fosfato por isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio sólido....	56
2.6 Solubilização de fosfato por isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio líquido..	56
2.7 Quantificação de fosfato.....	57

2.8 Identificação de ácidos orgânicos produzidos por <i>Pochonia chlamydosporia</i> (PC-10).	57
2.9 Cultivo dos isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio sólido e atividade de fosfatase .....	57
2.10 Produção e quantificação de auxina por isolados <i>Pochonia chlamydosporia in vitro</i> .	58
2.11 Teste colorimétrico para compostos fenólicos .....	58
2.12 Quantificação de fitohormônios produzidos por isolados <i>Pochonia chlamydosporia</i> por LC/MS-MS.....	59
2.13 Análise estatística .....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
3.1 Avaliação do extrato de <i>Pochonia chlamydosporia</i> (PC-10) .....	60
3.2 Produção de protease por <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio sólido.....	62
3.3 Proteômica.....	64
3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	64
3.3.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massas .....	65
3.4 Solubilização de fosfato por isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio sólido....	68
3.5 Solubilização de fosfato por isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio líquido..	69
3.6 Identificação de ácidos orgânicos produzidos por <i>Pochonia chlamydosporia</i> (PC-10).	71
3.7 Cultivo dos isolados <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio sólido e atividade de fosfatase .....	72
3.8 Produção de auxina por isolados <i>Pochonia chlamydosporia in vitro</i> e quantificação por teste espectrofotométrico .....	73
3.9 Teste colorimétrico para compostos fenólicos .....	74
3.10 Quantificação de fitohormônios por isolados <i>Pochonia chlamydosporia</i> por LC/MS-MS .....	76
4. CONCLUSÕES .....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
CONCLUSÕES GERAIS .....	89

## RESUMO

GOUVEIA, Angélica de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Análise de extratos fúngicos relacionados ao controle biológico de fitonematoides e à promoção de crescimento vegetal.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Filippe Elias de Freitas Soares, Humberto Josué de Oliveira Ramos e Thalita Suelen Avelar Monteiro.

O uso de fungos nematófagos tem sido mais investigado nos últimos anos por ser uma alternativa ecológica e eficiente no manejo integrado de nematoides. O potencial nematófago do *Monacrosporium thaumasium* foi verificado por meio da produção de compostos extracelulares com atividade nematocida. O extrato bruto obtido da fermentação sólida utilizando-se farelo de trigo foi fracionado e uma fração com atividade nematocida foi identificada. Os mesmos procedimentos foram efetuados para o tratamento testemunha, que não possuía o inóculo fúngico e obtiveram-se duas frações com atividade nematocida. Essas frações foram analisadas via espectrometria de massas e foi constatada similaridade entre o perfil das massas. Desse modo, não foi possível identificar compostos específicos da fração referente ao extrato fúngico e, provavelmente, o efeito nematocida é oriundo dos compostos do farelo de trigo. Também foram avaliados alguns compostos extracelulares produzidos por diferentes isolados do fungo *Pochonia chlamydosporia* (PC). Essa espécie é descrita por sua ação no controle biológico de fitonematoides e por promover o crescimento vegetativo. A produção de proteases foi verificada nos diferentes isolados e para o isolado PC-40 foi identificada a produção da protease subtilisina-like. A promoção de crescimento pode ser resultado de maior disponibilização de fosfato para a planta. Desse modo, a solubilização de fosfato por diferentes isolados de *P. chlamydosporia* foi avaliada em meio líquido e sólido confirmando-se a capacidade de solubilização por esses. Os isolados também foram aptos à produção de fosfatases extracelulares que podem auxiliar na liberação de fosfato de fontes orgânicas. Outro composto que pode contribuir para o desenvolvimento de plantas é o fitohormônio auxina, secretado pelos isolados PC-10 e PC-46 e detectado via LC/MS-MS. Através dos resultados, pode-se constatar que não são todos os isolados capazes de produzir auxina, bem como a existência de uma forte plasticidade na produção de diferentes compostos. Isso indica que é muito importante um *screening* inicial de isolados a fim de selecionar o ideal agente de controle biológico e/ou promotor de crescimento vegetal.

## ABSTRACT

GOUVEIA, Angélica de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Analysis of fungal extracts related to the biological control of phytonematodes and the promotion of plant growth.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisers: Filipe Elias de Freitas Soares, Humberto Josué de Oliveira Ramos and Thalita Suelen Avelar Monteiro.

The use of nematophagous fungi has been investigated in the last years. This is because it is an ecological and efficient alternative in the integrated management of nematodes. The nematophagous potential of *Monacrosporium thaumasium* was verified through the production of extracellular compounds with nematicidal activity. The crude extract obtained from solid fermentation using wheat bran was fractionated. A fraction with nematicidal activity was identified. The same procedures were performed for the control treatment, which did not have the fungal inoculum and obtained two fractions with nematicidal activity. These fractions were analysed by mass spectrometry and similarity was found between the mass profile. Thus, it was not possible to identify specific compounds of the fraction related to the fungal extract. Probably the nematicidal effect comes from wheat bran compounds. We also evaluated some extracellular compounds produced by different isolates of the fungus *Pochonia chlamydosporia* (PC). This species is described by its action in the biological control of phytonematodes and by promoting vegetative growth. Protease production was verified in the different isolates, for the PC-40 isolate the production of subtilisin-like protease was identified. Growth promotion may be the result of increased availability of phosphate to the plant. Thus, solubilisation of phosphate by different isolates of *P. chlamydosporia* was evaluated in liquid and solid medium, confirming the solubilisation capacity by them. The isolates were also suitable for the production of extracellular phosphatases that may aid in the release of phosphate from organic sources. Another compound that may contribute to the development of plants is the phytohormone auxin, secreted by PC-10 and PC-46 isolates and detected via LC / MS-MS. Through the results, it can be seen that not all the isolates are capable of producing auxin, as well as the existence of a strong plasticity in the production of different compounds. This indicates that initial screening of isolates in order to select the ideal biological control agent and / or plant growth promoter is very important.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da população nos últimos 50 anos resultou na necessidade de um aumento significativo da produção de alimentos (PINGALI, 2012), que foi alcançado com o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas, aumento do uso de fertilizantes e de agrotóxicos (AHMAD et al., 2012), mas acompanhado de danos ao meio ambiente. Doenças causadas por fitonematoides contribuem também para o aumento do uso de agrotóxicos, visto que esses auxiliam na redução do prejuízo econômico que os nematoides proporcionam em diferentes culturas, no entanto, esses químicos sintéticos apresentam grau de toxicidade para o ambiente e para o homem. Para evitar grandes problemas no futuro e manter o progresso da agricultura, torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas que minimizem os danos ao meio ambiente e contribuam para o rendimento da produção vegetal (LARRIBA et al., 2015).

Para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável alguns microrganismos podem contribuir de forma expressiva, devido a sua capacidade em colonizar a rizosfera e manter uma relação de simbiose com as plantas. Esses podem estar envolvidos na produção de metabólitos secundários relacionados ao melhor desenvolvimento das plantas, auxílio no controle de doenças e ao aumento da fertilidade do solo (KHAN et al., 2006; KHAN et al., 2010).

Nesse contexto, fungos endofíticos que protegem as plantas em determinadas condições de estresse se destacam, pois são capazes de habitar o interior das plantas durante algum período de seus ciclos de vida e estabelecer relações mutualísticas. Nessa interação, o fungo pode produzir compostos que auxiliam as plantas em diversos processos, como compostos fenólicos que induzem resistência tanto a fatores bióticos quanto abióticos (CARVALHO et al., 2016). O ácido clorogênico é um exemplo de composto fenólico sintetizado por *Sordariomyces sp.* que possui efeito inibitório sobre herbívoros e outros agentes patogênicos, aumentando a resistência das plantas (CHEN et al., 2010). Devido ao amplo espectro de compostos que podem ser produzidos por microrganismos, como metabólitos secundários e enzimas, é possível relacionar esses ao controle biológico de diferentes organismos.

O cultivo de *Fusarium oxysporum* em meio sólido (arroz) produz diferentes metabólitos com atividade nematicida. Dentre esses, o ácido indol acético, ácido 4-

hidroxibenzoico e gibepirona D, reduziram o número de *Meloidogyne incognita* em mais de 80% com 72 h de tratamento (BOGNER et al., 2017).

Por outro lado, o fungo *Monacrosporium thaumasium* é conhecido pelo seu potencial de controle biológico de nematoides de animais, nos quais o fungo e produtos do seu metabolismo, como proteases, apresentam efeitos nematicidas (SOARES et al., 2012; TAVELA et al., 2013). Em relação ao controle de fitonematoides por esse fungo, existem divergências, uma vez que há estudos em casa de vegetação demonstrando a sua eficiência em reduzir a população de *M. incognita* e ineficiência para *Meloidogyne javanica* (LOPES et al., 2007; CHOI et al., 2007). Alguns fatores podem explicar esses resultados, como o uso de isolados diferentes, o desenvolvimento do fungo não coincidir com a emergência e penetração dos juvenis nas raízes e o uso de culturas diferentes (LOPES et al., 2007). Gomes et al. (1999) demonstraram a capacidade do fungo em predação juvenis de *M. incognita in vitro*. Logo, a aplicação desse fungo para o controle de fitonematoides requer mais investigações. Avaliar produtos secretados por esse fungo pode ser relevante para correlacioná-lo com o controle biológico.

Por outro lado, o controle biológico de fitonematoides exercido pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* possui maior abrangência, visto que já foi descrito parasitando ovos de cinco diferentes gêneros de fitonematoides, sendo eles *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Rotylenchulus* e *Nacobbus* (MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2017). Esse fungo possui a capacidade de se desenvolver na rizosfera, porém quando ocorre contato com uma massa de ovos de fitonematoides, o fungo muda da fase saprofítica à fase parasitária, colonizando os ovos (BOURNE & KERRY, 1999). Para essa colonização é necessário a secreção de proteases, quitinases e lipases que resultam no sucesso da infecção, devido à organização da camada de proteção dos ovos de fitonematoides (KHAN et al., 2004; ESTEVES et al., 2009; GAUTAM et al., 2017).

A camada mais externa desses ovos é formada pela camada vitelínica constituída por lipoproteínas, a intermediária por quitina complexada com proteínas e a mais interna constituída por lipoproteínas de membrana (WHARTON, 1980). *P. chlamydosporia* é apto à produção de diferentes enzimas, sendo as proteases (VCP e SCP1) e quitinases as mais estudadas devido a sua ação no processo infeccioso dos ovos. Como a principal barreira de proteção dos ovos de fitonematoides é constituída pelos substratos das enzimas produzidas pelo fungo, ocorrerão danos nessas camadas permitindo que o fungo tenha acesso ao interior do ovo e consuma o juvenil ( KHAN et al., 2004; ESTEVES et al., 2009).

As proteases VCP1 e SCP1 são as mais estudadas de *P. chlamydosporia*, a primeira foi purificada em 1994 e isso permitiu a sua caracterização em relação a variáveis como substrato, temperatura, peso molecular e ação em ovos de fitonematoides. Nesse estudo, foi relatado que a enzima compartilha várias características com Prl, principal protease secretada por *Metarhizium anisopliae* (SEGERS et al., 1994). Em relação a SCP1, a única informação era sobre sua atividade no endofitismo do fungo (LOPEZ-LLORCA et al., 2010), porém, recentemente, foi observado que essa protease está presente no momento da formação do apressório e do tubo germinativo, permitindo associa-la ao processo infeccioso do fungo em ovos de nematoides de galhas (ESCUADERO et al., 2016).

Atualmente os estudos dessas proteases têm avançado muito devido ao uso de ferramentas de bioinformática que disponibilizam novas informações no que se refere à estrutura tridimensional da protease VCP1 a partir de comparação com outras proteínas degradadoras de cutícula, por exemplo, PR1 e Ver112. Essas ferramentas são vantajosas, pois o conhecimento sobre a estrutura pode auxiliar na compreensão do mecanismo de catálise e especificidade. Os modelos da estrutura tridimensional preditos para as enzimas PR1, VCP1 e Ver112 apresentaram similaridades como formação de pontes dissulfetos, sítios de ligação de cálcio, semelhanças em propriedades físico-químicas e em condições ideais e alta identidade de sequência. No entanto, diferenças conformacionais foram encontradas na região de loop na porção C e N-terminal e mudanças de resíduos na região do sítio ativo, que pode proporcionar variação na especificidade ao substrato (LIU et al., 2007).

Além da ação do *P. chlamydosporia* no controle biológico, estudos recentes demonstraram também sua eficácia em proporcionar maior desenvolvimento de culturas de trigo, tomate e cevada, que pode estar relacionado à capacidade de solubilizar fosfato e produção de fitohormônios (MONFORT et al., 2005; MACIÁ-VICENTE et al., 2009; ROSSO et al., 2014; ZAVALA-GONZALEZ et al., 2015).

Produtos do metabolismo de *P. chlamydosporia* que proporcionam maior crescimento vegetativo vêm sendo estudados amplamente, desde estudos referentes à mudança de expressão de determinados genes a ensaios em casa de vegetação acompanhando o desenvolvimento de raiz e parte aérea, tempo de florescência e frutificação (MONTEIRO, 2013; DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2015; ZAVALA-GONZALEZ et al., 2015; ZAVALA-GONZALEZ et al., 2016). Logo, verificar a capacidade de liberação de fosfato e a produção de hormônios por diferentes isolados desse microrganismo é de grande relevância

para o uso na agricultura, uma vez que isolados diferentes promovem o crescimento de formas diferentes (ROSSO et al., 2014).

O fósforo é essencial para as plantas, uma vez que está relacionado com a produção do rRNA, que é responsável pela síntese de proteínas envolvidas no metabolismo e crescimento das plantas (REICH et al., 2010; ELSER, 2012). Esse elemento constitui estruturas de biomoléculas envolvidas em diferentes vias como fotossíntese, biossíntese de fosfolípídeos e ácidos nucleicos, e regula reações enzimáticas controlando vias metabólicas, por meio de complexação com outras moléculas (THEODOROU & PLAXTON, 1993; BATTINI et al., 2017).

O solo é constituído de grande quantidade de fosfato, no entanto, apenas uma pequena porção de ânions ortofosfato (predominantemente como  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ ) está disponível para absorção pelas plantas. Essa baixa disponibilidade é principalmente devido à alta reatividade do ortofosfato com outros componentes do solo como cálcio, ferro e alumínio (YADAV & VERMA, 2012).

O fosfato presente no solo pode ser encontrado na forma de fosfatos orgânicos como ésteres de ácido ortofosfórico (inositol fosfato), sendo o fitato (inosital hexafosfato) o composto mais abundante (RODRÍGUEZ et al., 2006). A formação dos fosfatos orgânicos ocorre devido à aplicação de resíduos vegetais e animais ao solo e dos seus resíduos de decomposição (CONTE et al., 2002; MARTINAZZO et al., 2007). A disponibilização de fosfato desses compostos requer o processo de mineralização a partir de fosfatases que utilizam o fosfato orgânico como substrato (RICHARDSON, 2001).

O fósforo pode ser adsorvido a argilas e óxidos de Fe e Al ou precipitados com Fe, Al e Ca e conseqüentemente torna-se indisponível para a planta. Esses complexos formados representam a porção de fosfato inorgânico presente no solo. Em solos ácidos, a formação de complexos com alumínio, ferro e manganês é favorecida e em solos alcalinos, o P reage fortemente com o elemento cálcio (YADAV & VERMA, 2012; LOPEZ-ARREDONDO & HERRERA-ESTRELLA, 2012). Para a disponibilização do P dessas fontes, os microrganismos possuem alguns mecanismos como a liberação de ácidos orgânicos ou apenas pela liberação de  $\text{H}^+$  em processos de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  (JONES, 1998; NAIK et al., 2013).

Dentre os ácidos orgânicos que podem ser liberados, malato, citrato e oxalato possuem maior afinidade por metais trivalentes, como  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . Como esses metais predominam em solos ácidos, esses podem favorecer o mecanismo de solubilização via formação de

complexos. Oxalato na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  tem tendência a precipitar, embora isso reduza a sua capacidade de complexação com alguns nutrientes, pode ser importante na liberação de P do  $\text{Ca}^{2+}$  como em minerais de apatita [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$ ] (JONES, 1998).

O processo de complexação do fósforo no solo resulta em baixa concentração desse mineral disponível para as plantas, sendo necessário o uso de fertilizantes fosfatados, pois a deficiência de fósforo resulta em crescimento atrofiado, folhas escuras, inibição da floração e do desenvolvimento da raiz. No entanto, com o passar do tempo, 60-70% do mineral proveniente do fertilizante torna-se indisponível para a captação pelas plantas devido à fixação com os constituintes do solo, sendo necessário o uso frequente desses fertilizantes (HAO et al., 2002; SPAGNOLETTI et al., 2016; YADAV et al., 2017).

O fertilizante fosfatado é o segundo fertilizante de maior demanda no mundo (FAO-faostat.fao.org) e sua produção ocorre a partir de rochas fosfáticas (RFs) ricas em apatita [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$ ] (NOVAIS & SMITH, 1999; VASSILEV et al., 2014). Na indústria utiliza-se o tratamento com ácido sulfúrico para a solubilização do fósforo presente nas rochas. Todavia, o processo gera resíduos como vapores tóxicos e subprodutos que apresentam alto potencial de contaminação para água e ar. Logo, são necessários investimentos no processo para reduzir esses poluentes, contribuindo para o elevado preço do produto final (SAHU et al., 2014; HASSAN et al., 2016).

Mesmo com o alto custo dos fertilizantes fosfatados, esses são necessários para o melhor desenvolvimento das plantas, e ao longo dos anos o seu uso cresceu muito, aumentando a quantidade de fósforo no solo que a planta não consegue absorver. Durante processos como a lixiviação do solo esse fósforo pode chegar à água causando eutrofização que proporciona aumento da biomassa de fitoplâncton, hipóxia, mortalidade de peixes e a água pode apresentar características não desejadas quanto à cor e sabor (DODDS et al., 2009; CARPENTER et al., 2011).

Deste modo, o uso de fertilizantes com o acréscimo de fósforo é necessário para a produção de alimentos, no entanto a sua utilização provoca desequilíbrio ambiental. Além do mais, o fósforo utilizado é de origem de fontes não renováveis de depósitos geológicos encontrados em poucos países, o que pode comprometer futuramente a segurança alimentar. Nessas circunstâncias, pesquisas, transferências de tecnologias e inovações necessitam de dedicação para lidar com o problema, de forma que diminua o uso, assim como o reaproveitamento do elemento já existente no solo (CORDELL et al., 2009).

Estudos com microrganismos têm se destacado nas pesquisas como uma alternativa mais sustentável para fornecer o mineral tão essencial às plantas. Bactérias e fungos podem ser aplicados em semente, no solo ou próximos a superfície da planta e são capazes de colonizar a rizosfera, auxiliando no crescimento vegetal, devido a diferentes compostos que são capazes de produzir (VASSILEV et al., 2017).

No contexto de interação de microrganismos com plantas, destaca-se a capacidade de desses sintetizarem fitohormônios que podem melhorar a qualidade e a produtividade de cultivares de importância econômica. A produção de auxina e giberelina são relatadas por fungos endofíticos como *Paecilomyces formosus* LHL10 e *Fusarium oxysporum*, ambos os hormônios relacionados ao crescimento vegetal (KHAN et al., 2012; BOGNER et al., 2017).

A auxina é um dos principais hormônios de plantas estudados devido à sua relação com a regulação do crescimento. A primeira auxina foi identificada como ácido indol acético (AIA). Posteriormente, outras foram descobertas como o ácido fenil-acético e o ácido 4-Cl - indol-3-acético (KORASICK et al., 2013).

As vias biossintéticas em plantas para AIA podem ser classificadas como dependente de triptofano (TRP) se AIA for derivado via metabolismo desse aminoácido, ou como independente do TRP se o precursor for indol-3-glicerol-fosfato. A via dependente de TRP possuem diferentes rotas biossintéticas para a produção de AIA em plantas (WOODWARD & BARTEL, 2005; NORMANLY, 2010; PIECK et al., 2015) e em microrganismos (GLICK et al., 1999).

Esse hormônio possui atuação em todas as fases de desenvolvimento da planta, uma vez que regula a divisão celular, expansão celular e diferenciação celular, e atua no desenvolvimento de raízes e da parte aérea, proporcionando assim alongamento de caule, diferenciação do floema e do xilema, aumento da formação de raízes laterais e redução da senescência de folhas. No entanto, a concentração de AIA é determinante para promover essas vantagens para as plantas, pois em altas concentrações pode ser um inibidor do crescimento. Para manter a homeostase da célula quanto à concentração do hormônio, a planta utiliza de mecanismos de conjugação da auxina com aminoácidos e açúcares, visto que apenas a sua forma livre é considerada ativa (LUDWIG-MÜLLER, 2011; LUDWIG-MÜLLER, 2015).

A capacidade de *P. chlamydosporia* em solubilizar fosfato, produzir auxina e ser efetivo no controle biológico de fitonematoides pode ser muito eficaz para a promoção de crescimento das plantas (ZAVALA-GONZALEZ et al., 2015; BONTEMPO et al., 2017; XAVIER et al., 2017). Outros fungos como *Penicillium oxalicum*, também possuem a

combinação de controle biológico de fungos com a solubilização de fosfato associado à melhor desenvolvimento da planta (LIPPING et al., 2008; YIN et al., 2015).

O estudo de diferentes microrganismos pode ser benéfico para o desenvolvimento de alternativas mais sustentáveis para a agricultura e se o microrganismo além do controle biológico atuar na promoção de crescimento mais vantajoso se torna essa associação devido a maior produtividade. Com base no exposto, o trabalho teve como objetivo detectar possíveis compostos com atividade nematicida produzido por *M. thaumasium* e estudar compostos extracelulares de *P. chlamydosporia* relacionados ao controle biológico de fitonematoides e à promoção de crescimento vegetal.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, P.; ASHRAF, M.; YOUNIS, M.; HU, X.; KUMAR, A.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 524-540, 2012.

BATTINI, F.; GRONLUND, M.; AGNOLUCCI, M.; GIOVANNETTI, M.; JAKOBSEN, I. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Scientific Reports*, v.7, p. 1-11, 2017.

BOGNER, C. W.; KAMDEM, R. S. T.; SICHTERMANN, G.; MATTHÄUS, C.; HÖLSCHER, D.; POPP, J.; PROKSCH, P.; GRUNDLER, F. M. W.; SCHOUTEN, A. Bioactive secondary metabolites with multiple activities from a fungal endophyte. *Microbial Biotechnology*, v. 10, p. 175-188, 2017.

BONTEMPO, A. F.; LOPES, E. A.; FERNANDES, R. H.; DE FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R. Dose-response effect of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne incognita* on carrot under field conditions. *Revista Caatinga*, v. 30, p. 258-262, 2017.

BOURNE, J.M. & KERRY, B.R. Effect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 31, p. 75-84, 1999.

CARPENTER, S.R.; BENNETT, E.M. Reconsideration of the planetary boundary for phosphorus. *Environmental Research Letters*, v.6, p. 1-12, 2011.

CARVALHO, P.L.N.; SILVA, E.O.; CHAGAS-PAULA, A.D.; LUIZ, J.H.H.; IKEGAKI, M. Importance and Implications of the Production of Phenolic Secondary Metabolites by Endophytic Fungi: A Mini-Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 259-271, 2016.

CHEN, X.; SANG, X.; LI, S.; ZHANG, S.; BAI, L. Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 447-454, 2010.

CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D.S. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após aplicações de fosfato em solo no sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 26, p. 925-930, 2002.

CORDELL, D.; DRANGERT, J-O.; WHITE, S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, v.19, p. 292-305, 2009.

CHOI, Y.H; KIM,K.K.; SON, H.J.; SHIN,H.S.; PARK,H.C. Development of a biocontrol agent using *Monacrosporium thaumasium* to a control a root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. v. 17, p. 1605-1609, 2007.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G. de; LOPES, E. A.; SILVA, M. D. C. S. da; KASUYA, M. C. M.; FERRAZ, S. *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 37, p. 417-423, 2015.

DODDS, W.K.; BOUSKA, W.W.; EITZMANN, J.L.; PILGER, T.J.; PITTS, K.L.; RILEY, A.J.; SCHLOESSER, J.T.; THORNBRUGH, D.J. Eutrophication of US freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environmental Science & Technology*, v. 43, p. 12-19, 2009.

ELSER, J. J. Phosphorus: A limiting nutrient for humanity? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p. 833-838, 2012.

ESCUADERO, N.; FERREIRA, S. R.; LOPEZ-MOYA, F. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Biology*, v.120, p. 572-585, 2016.

ESTEVEZ, I.; PETEIRA, B.; ATKINS, S. D.; MAGAN, N.; KERRY, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*, v. 113, p. 867-876, 2009.

GAUTAM, N. K.; MARLA, S. S.; MIRZA, N.; KHAN, Z.; SINGH, B.; WANKHEDE, D. P.; GAWADE, B. H. Evaluation of field pea accessions for root-knot nematode resistance and possible role of NADP dependent malic enzyme gene in host resistance. *Indian Journal of Genetics*, v. 77, p. 556-563, 2017.

GOMES, A. P. S.; ARAÚJO, J. V.; RIBEIRO, R. C. F. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 79-83, 1999.

GLICK, B.R.; PATTEN, C.L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D.M. Auxin production. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press, p. 86-133, 1999.

HAO, X.; CHO, C.M.; RACZ, G.J.; CHANG, C. Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.64, p. 213-224, 2002.

HASSAN, N. M.; MANSOUR, N. A.; FAYEZ-HASSAN, M.; SEDQY, E. Assessment of natural radioactivity in fertilizers and phosphate ores in Egypt. *Journal of Taibah University for Science*, v. 10, p. 296-306, 2016.

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil*, v. 205, p. 25-44, 1998.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; KANG, S.; KIM, Y.; JUNG, H.; LEE, J.; LEE, I. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology*, v.12, p. 1-14, 2012.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biological Control*, v. 31, p. 346-352, 2004.

KHAN, M S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 27, p. 29-43, 2006.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - Current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 56, p. 73-98, 2010.

KORASICK, D. A.; ENDERS, T. A.; STRADER, L. C. Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 2541-2555, 2013.

LARRIBA, E.; JAIME, M. D. L. A.; NISLOW, C.; MARTÍN-NIETO, J.; LOPEZ-LLORCA, L.V. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research*, v. 128, p. 665-678, 2015.

LIPPING, Y.; JIATAO, X.; DAOHONG, J.; YANPING, F.; GUOQING, L.; FANGCAN, L. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1 potential antibiotics against plant pathogenic fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 24, p. 909-915, 2008.

LIU, S. Q.; MENG, Z. H.; YANG, J. K.; FU, Y. X.; ZHANG, K. Q. Characterizing structural features of cuticle-degrading proteases from fungi by molecular modeling. *BMC Structural Biology*, v. 7, p. 1-14, 2007.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S. L. Potencial de Isolados de Fungos Nematófagos no Controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, v. 31, p. 78-84, 2007.

LOPEZ-ARREDONDO, D. L. & HERRERA-ESTRELLA, L. Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. *Nature Biotechnology*, v. 30, p. 889-893, 2012.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; GÓMEZ-VIDAL, S.; MONFORT, E.; LARRIBA, E.; CASADO-VELA, J.; ELORTZA, F.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J.; MARTÍN-NIETO, J. Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, p. 342-351, 2010.

LUDWIG-MÜLLER, J. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 1757-73, 2011.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *Journal of plant physiology*, v. 172, p. 4-12, 2015.

MACIÁ-VICENTE, J.G.; JANSSON, H.B.; TALBOT, N.J.; LOPEZ-LLORCA, L.V. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist*, v.182, p. 213-228, 2009.

MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; ESTEVES, I.; DEVONSHIRE, J. Biology and Management of *Pochonia chlamydosporia* and Plant-Parasitic Nematodes. In: MANZANILLA-LÓPEZ, R.H. & LOPEZ-LLORCA, L.V. (Eds). *Perspectives in Sustainable Nematode Management Through Pochonia chlamydosporia Applications for Root and Rhizosphere Health*. Springer International Publishing, p.47, 2017.

MARTINAZZO, R.; RHEINHEIMER, D.S.; GATIBONI, L.; BRUNETO, G.; KAMINSKI, J. Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 31, p. 563-570, 2007.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; PARK, J.O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and development of root-rot. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 37, p. 1229-1235, 2005.

MONTEIRO, T.S.A. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia*

de *Flagrans* (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa, p. 47, 2013.

NAIK, S. K.; MAURYA, S.; KUMAR, R.; SADHNA, K.; GAGRAI, S.; DAS, B.; KUMAR, S.; BHATT, B. P. Inorganic phosphate solubilization by phosphate solubilizing fungi isolated from acidic soils. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 4310-4316, 2013.

NORMANLY, J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, p. 1-17, 2010.

NOVAIS, R.F. & SMITH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Editora UFV, p. 399, 1999.

PIECK, M.; YUAN, Y.; GODFREY, J.; FISHER, C.; ZOLJ, S.; VAUGHAN, D.; THOMAS, N.; WU, C.; RAMOS, J.; LEE, N.; NORMANLY, J.; CELENZA, J. L. Auxin and tryptophan homeostasis are facilitated by the ISS1/VAS1 aromatic aminotransferase in *Arabidopsis*. *Genetics*, v. 201, p. 185-199, 2015.

PINGALI, P. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 109, p. 12302-12308, 2012.

REICH, P. B.; OLEKSYN, J.; WRIGHT, I. J.; NIKLAS, K. J.; HEDIN, L.; ELSER, J. J. Evidence of a general  $2/3$ -power law of scaling leaf nitrogen to phosphorus among major plant groups and biomes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 277, p. 877-883, 2010.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, p. 897-906, 2001.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, v. 287, p. 15-21, 2006.

ROSSO, L. C.; COLAGIERO, M.; SALATINO, N.; CIANCIO, A. Observations on the effect

of trophic conditions on *Pochonia chlamydosporia* gene expression. *Annals of Applied Biology*, v. 164, p. 232-243, 2014.

SAHU, S. K.; AJMAL, P. Y.; BHANGARE, R. C.; TIWARI, M.; PANDIT, G. G. Natural radioactivity assessment of a phosphate fertilizer plant area. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 7, p. 123-128, 2014.

SEGERS, R.; BUTT, T. M.; KERRY, B. R.; PEBERDY, J. F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. *Microbiology*, v. 140, p. 2715-2723, 1994.

SOARES, F.E.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; LIMA, W.S.; MOZER, L.R.; QUEIROZ, J.H. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitology Research*, v. 110, p. 2423-2427, 2012.

SPAGNOLETTI, F. N.; TOBAR, N. E.; FERNÁNDEZ DI PARDO, A.; CHIOCCHIO, V. M.; LAVADO, R. S. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Applied Soil Ecology*, v. 111, p. 25-32, 2017.

TAVELA, A. de O.; DE ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; DA SILVEIRA, W. F.; DORNELAS E SILVA, V. H.; CARRETTA JÚNIOR, M.; BORGES, L. A.; ARAUJO, J. M.; BENJAMIN, L. dos A.; CARVALHO, G. R.; DE PAULA, A. T. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science*, v. 94, p. 568-572, 2013.

THEODOROU, M.E. & PLAXTON, W.C. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology*, v.101, p. 339-344, 1993.

VASSILEV, N.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; FLOR-PEREGRIN, E.; MARTOS, V.; REYES, A.; VASSILEVA, M. Production of a potential liquid plant bio-stimulant by immobilized *Piriformospora indica* in repeated-batch fermentation process. *AMB Express*, v. 7, p. 1-7, 2017.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiology Journal*, v. 31, p. 751-763, 2014.

WHARTON, D. Nematode egg-shells. *Parasitology*, v.81, p. 447-463, 1980.

WOODWARD, A.W. & BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, v.95, p. 707-735, 2005.

XAVIER, D. M.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; DE FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; GARDIANO, C. G.; FERRAZ, S. Combination of isolates of *Pochonia chlamydosporia* for the control of *Meloidogyne javanica* in tomato. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, v. 33, p. 2015-2018, 2017.

YADAV, B.K. & VERMA, A. Phosphate Solubilization and Mobilization in Soil Through Microorganisms Under Arid Ecosystems. In: ALI, M. (Ed). *The Functioning of Ecosystems*. InTech, p. 93-103, 2012.

YADAV, H.; FATIMA, R.; SHARMA, A.; MATHUR, S. Enhancement of applicability of rock phosphate in alkaline soils by organic compost. *Applied Soil Ecology*, v. 113, p. 80-85, 2017.

YIN, Z.; SHI, F.; JIANG, H.; ROBERTS, D. P.; CHEN, S.; FAN, B. Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 11, p. 1-11, 2015.

ZAVALA-GONZALEZ, E. A.; ESCUDERO, N.; LOPEZ-MOYA, F.; ARANDA-MARTINEZ, A.; EXPOSITO, A.; RICAÑO-RODRÍGUEZ, J.; NARANJO-ORTIZ, M. A.; RAMÍREZ-LEPE, M.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology*, v. 166, p. 472-483, 2015.

ZAVALA-GONZALEZ, E. A.; RODRÍGUEZ-CAZORLA, E.; ESCUDERO, N.; ARANDA-MARTINEZ, A.; MARTÍNEZ-LABORDA, A.; RAMÍREZ-LEPE, M.; VERA, A.; LOPEZ-LLORCA, L. V. *Arabidopsis thaliana* root colonization by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is modulated by jasmonate signaling and leads to accelerated flowering and improved yield. *New Phytologist*, v. 213, p. 351-364, 2016.

# *Capítulo 1*

Purificação parcial de compostos com atividade nematicida  
em condições de fermentação sólida

## RESUMO

GOUVEIA, Angélica de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Purificação parcial de compostos com atividade nematocida em condições de fermentação sólida.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Filippe Elias de Freitas Soares, Humberto Josué de Oliveira Ramos e Thalita Suelen Avelar Monteiro.

O fungo *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *in vitro*, é capaz de preda juvenis de *Meloidogyne incognita*. Porém a ação de compostos secretados pelo fungo em fitonematoides ainda não foi descrita. Desse modo, avaliou-se a capacidade do fungo em produzir metabólitos secundários com atividade nematocida. Cultivou-se o fungo em meio com farelo de trigo e solução de minerais. O tratamento testemunha possuía o meio de cultivo com a mesma composição, porém sem o inóculo fúngico. Os extratos aquosos obtidos foram fracionados por ultrafiltração, precipitação com acetona, precipitação em meio básico e por cromatografia em fase sólida (SPE). As subfrações da cromatografia foram obtidas a partir de eluição com acetonitrila e água as quais foram utilizadas para os testes de efeito nematocida. As frações que provocaram mortalidade dos fitonematoides foram analisadas por LC/MS-MS. Elevadas taxas de mortalidade dos juvenis foram observadas tanto para as frações obtidas na presença quanto na ausência do fungo. Essas frações obtiveram os perfis de massas similares, não permitindo detectar a presença de um composto produzido especificamente pelo fungo. Alguns compostos putativos foram identificados e avaliados, dentre esses betaína e valina, mas esses não são relacionados com a morte dos juvenis. Deste modo, a purificação e a identificação do composto responsável pelo efeito nematocida não foi possível nesse estudo, mas a identificação da fração com esse efeito foi um progresso, visto que não existem informações sobre compostos do farelo de trigo com atividade nematocida.

Palavras chave: *Monacrosporium thaumasium*, farelo de trigo, metabólito e atividade nematocida.

## ABSTRACT

GOUVEIA, Angélica de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Partial purification of compounds with nematicidal activity under solid fermentation conditions.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisers: Filipe Elias de Freitas Soares, Humberto Josué de Oliveira Ramos and Thalita Suelen Avelar Monteiro.

In vitro, the fungus *Monacrosporium thaumasium* (NF34) is capable of preying juveniles of *Meloidogyne incognita*. However, the action of compounds secreted by the fungus in phytonematodes has not been described. Thus, the ability of the fungus to produce secondary metabolites with nematicidal activity was evaluated. The fungus was grown in culture medium with wheat bran and mineral solution. The control treatment contained the culture medium with the same composition, except for fungal inoculum. The aqueous extracts obtained were fractionated by ultrafiltration, acetone precipitation, basic media precipitation and solid phase chromatography. Chromatography subfractions were eluted with acetonitrile and water which were used for nematicidal tests. The fractions that caused phytonutrient mortality were analysed by LC / MS-MS. High juvenile mortality rates were observed both for the fractions obtained in the presence and absence of the fungus. These fractions had the profiles of similar masses, not allowing to detect the presence of a compound produced specifically by the fungus. Some putative compounds have been identified and evaluated, among these betaine and valine, but these compounds are not related to juvenile death. Thus, it was not possible to purify and identify the compound responsible for the nematicidal effect in this study. However, the identification of the fraction with this effect was an improvement, since there is no information on wheat bran compounds with nematicidal activity.

Keywords: *Monacrosporium thaumasium*, wheat bran, metabolite e nematicidal activity.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos nematófagos são encontrados no solo e na matéria orgânica em decomposição. Esses são capazes de produzir enzimas extracelulares que auxiliam no processo de predação e facilitam o acesso do fungo ao interior do nematoide (LIANG et al., 2011). Esse processo pode se tornar mais eficiente quando conjugado com a produção de metabólitos secundários que auxiliam na paralisação ou provocam a morte do nematoide (DEGENKOLB & VILCINSKAS, 2015).

Parte desses microrganismos apresenta estruturas especializadas para a captura de nematoides, através da imobilização o que facilita a penetração das hifas e, conseqüentemente, a digestão dos nematoides (WANG et al., 2006). O fungo *Monacrosporium thaumasium* conhecido também como *Arthrobotrys thaumasia*, tem predisposição para a produção de hifas armadilhas no formato redes adesivas, que em situação de contato com nematoides estes ficam presos e são mortos e consumidos pelo fungo. Dessa forma, o fungo tornou-se alvo de estudos devido à possibilidade de utiliza-lo como controle biológico. Araújo et al. (2007) demonstraram a eficiência desse fungo no controle de nematoides gastrintestinais de caprinos e Soares et al. (2012) identificaram uma protease secretada por esse fungo importante no processo de infecção da larva de *Angiostrongylus vasorum*, certificando-se da importância das macromoléculas produzidas pelo microrganismo. No entanto, não existem informações sobre a produção de metabólitos secundários com atividade nematicida por *M. thaumasium*.

Os fungos produzem diversos metabólitos, que podem ser divididos em primários e secundários. Os primários são produzidos durante a fase vegetativa, já os secundários, sintetizados quando o crescimento do microrganismo atinge a fase estacionária. Esses compostos podem apresentar atividade bactericida, fungicida, nematicida, entre outras. Para os fungos a produção desses compostos pode significar sobrevivência devido à competição com outros microrganismos no ambiente (KELLER et al., 2005).

Apesar da diversidade dos metabólitos secundários, esses apresentam características comuns como: baixa massa molecular, não são todos os isolados de uma mesma espécie que possuem a capacidade de produzir determinado metabólito, o meio de cultivo do microrganismo influencia na produção, a produção não afeta o crescimento e reprodução do microrganismo e são codificadas por um conjunto de genes dispensáveis (BENNETT & BENTLEY, 1989; MARTÍN et al., 2005; PUSZTAHELYI et al., 2015).

A etapa de biossíntese de metabólitos secundários é catalisada por diferentes enzimas e, a partir da via de síntese, existem cinco classes de metabólitos secundários: peptídeos não ribossomais, policetídeos, híbridos NRPS-PKS, alcaloides indol e terpenos (HOFFMEISTER & KELLER, 2007; KHALDI, et al., 2010).

A classe de peptídeos não ribossomais é derivada de aminoácidos proteicos e não proteicos através da enzima peptídeo sintase não ribossomal. A diversidade desses compostos é de acordo com o tamanho da cadeia do peptídeo e a forma ciclizada ou linear. O fungo *Omphalotus olearius* é um exemplo de microrganismo que sintetiza metabólito dessa classe. Ele é capaz de produzir a toxina *omphalotin A*, responsável pela eficiente redução do número de juvenis de *Meloidogyne incognita in vitro* (ZIEMERT et al., 2012; BÜCHEL et al., 1998).

Os policetídeos correspondem à classe mais abundante de metabólitos, que incluem diferentes tipos de pigmentos não carotenoides e, conseqüentemente, a de maior diversidade estrutural e são sintetizados pela policetídeo sintase. Fungos, como *Pochonia chlamydosporia*, produzem aurovertina que pertence a essa classe e se destaca devido ao seu efeito nematocida em fitonematoides. O mecanismo de ação desse composto está relacionado com a inibição da subunidade  $\beta$  da  $F_1$ -ATPase, todavia esse não é um alvo específico para ação de todas aurovertinas (ZIEMERT et al., 2012; WANG et al., 2015).

A classe dos híbridos NRPS-PKS é representada por poucos compostos e sua síntese envolve a combinação de mecanismos referentes aos peptídeos não ribossomais e policetídeos. O fungo *Talaromyces thermophilus* produz metabólito dessa classe que possui atividade nematocida contra *M. incognita*, *Bursaphelenchus xylophilus* e *Panagrellus redivivus* (NIU et al., 2014; PUSZTAHELYI et al., 201). Essa informação evidencia a diversidade de compostos bioativos que fungos são capazes de produzir contribuindo para a aplicação de microrganismos no controle de doenças causadas por fitonematoides.

Os metabólitos pertencentes à classe dos alcaloides indol geralmente são derivados do triptofano e pirofosfato de dimetililo sendo a síntese efetuada pelas enzimas feniltransferases (BRAKHAGE, 2013). Bogner et al. (2017) constaram pela primeira vez que um composto dessa classe, o ácido indol acético, produzido pelo fungo *Fusarium oxysporum*, é eficiente na redução do número de juvenis de *M. incognita in vitro*.

A classe dos terpenos é a mais conhecida, sendo muito comum em plantas, mas fungos também são capazes de produzir importantes terpenos, por exemplo, a gibberelina. Os compostos dessa classe possuem uma estrutura semelhante visto que todos dispõem de muitas unidades de isopreno, que podem estar organizadas na forma linear ou cíclica, saturada ou

insaturada e com modificações. As ciclases terpenos atuam nas ciclizações dos isoprenoides para a formação dos diferentes terpenos (KELLER et al., 2005; BRAKHAGE, 2013). O fungo *Dichomitus squalens* é capaz de produzir compostos dessa classe, os quais sesquiterpenos foram utilizados em testes *in vitro* e apresentaram atividade nematicida contra *B. xylophilus* (HUANG et al., 2004).

Nesse contexto, a identificação de novos compostos é fundamental para solucionar os problemas gerados por fitonematoides. Justifica-se investigar novas alternativas para o controle biológico desses patógenos ou tentar intensificar o efeito dos nematicidas presentes no mercado através da adição de metabólitos secundários, que poderia acarretar na diminuição de compostos tóxicos liberados no ambiente. Deste modo, o objetivo do trabalho foi purificar e identificar os metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* em meio sólido, que possui efeito nematicida em fitonematoides.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Cultivo de *Monacrosporium thaumasium* em meio sólido**

O isolado NF34 de *M. thaumasium* utilizado nesse estudo pertence à micoteca do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária e foi mantido em placas de Petri em meio sólido de ágar batata dextrose (BDA).

O fungo *M. thaumasium* foi repicado em placas de Petri contendo BDA e após sete dias de incubação foi utilizado como o inóculo. Para o cultivo do fungo, o meio de cultura sólido continha 5g de farelo trigo e 7,5 mL de solução composta por  $K_2HPO_4$  (5,0 g/L),  $MgSO_4$  (0,10 g/L) e extrato de levedura (10 g/L). Os meios foram esterilizados em autoclave por 15 min a 121°C e em seguida, em ambiente estéril, o inóculo foi acrescentado aos meios. O cultivo do fungo ocorreu por dez dias a 28°C. O tratamento testemunha foi preparado do mesmo modo, porém sem o inóculo fúngico.

### **2.2 Obtenção dos extratos**

Aos meios de cultivos, com e sem o fungo, foram acrescentados 40 mL de água destilada e os recipientes foram mantidos sob agitação em shaker a 150 rpm, durante 1 h, a 15°C. Posteriormente, o meio foi filtrado com filtro de nylon e o sobrenadante foi

centrifugado a 10000 g por 30 min a 4°C obtendo-se o extrato referente a fermentação do fungo (extrato bruto 1) e o extrato sem a presença do fungo (extrato 2).

### **2.3 Obtenção de *Meloidogyne javanica***

Os ovos de *Meloidogyne javanica* foram obtidos de raízes de tomateiro trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio 0,5% de cloro ativo. A suspensão aquosa foi vertida em peneiras granulométricas para a obtenção da suspensão de ovos (BONETTI & FERRAZ, 1981). Ovos de *M. javanica* foram colocados em funil de Baerman por 48 h para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) e esses foram utilizados nos testes de ação nematicida.

### **2.4 Ensaio de atividade nematicida com os extratos brutos**

O teste de atividade nematicida consistiu em acrescentar 20 juvenis de segundo estágio de *M. javanica* a uma alíquota de 50µL do extrato de *M. thaumasium* em tubos eppendorfs, que foram mantidos a 28°C por 24 h. Para o preparo das amostras foi fervido 1 mL do extrato bruto por 30 min e foi aquecido 1 mL do extrato até secar e em seguida, ressuspensionado com água. Essas amostras e o extrato não fervido foram utilizadas no teste nematicida. Para a testemunha do teste, foi utilizada água deionizada e 20 juvenis de *M. javanica*. Após o tempo de incubação, com auxílio de um microscópio óptico, foi verificado o índice de mortalidade dos nematoides por meio da avaliação da movimentação. Para certificar-se que os juvenis paralisados estavam mortos foi adicionado NaOH 0,1N, como proposto por Chen & Dickson (2000). Nessa metodologia, se os nematoides estiverem apenas paralisados, a adição do NaOH induz o retorno da movimentação. Para cada tratamento foram realizadas seis repetições do teste de atividade nematicida. Os mesmos procedimentos foram realizados utilizando-se o extrato 2 (farelo de trigo).

### **2.5 Fracionamento dos extratos**

O extrato fúngico e o extrato do farelo de trigo foram fracionados por diferentes metodologias, com a finalidade de isolar os compostos com atividade nematicida e

consequentemente identifica-lo. Todas as etapas de fracionamento foram repetidas quatro vezes. O processo de fracionamento das amostras é representado na **Figura 1**.

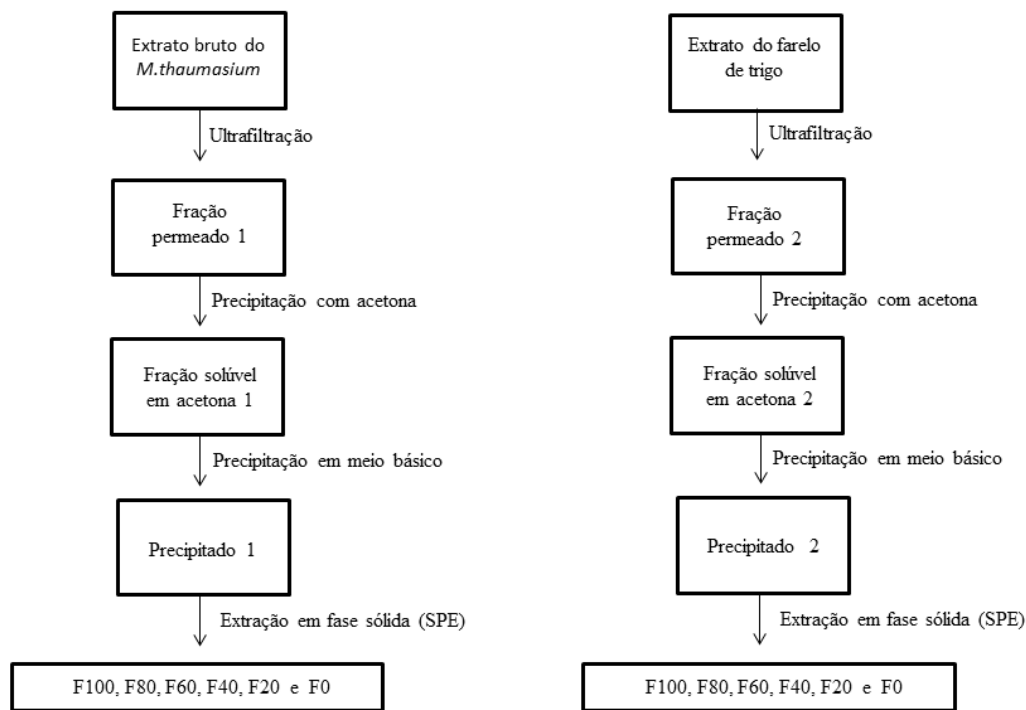


Figura 1: Fluxograma do fracionamento realizado para o extrato bruto de *M. thaumasium* e para o extrato de farelo de trigo.

### 2.5.1 Ultrafiltração e ensaio de atividade nematocida

O extrato 1 (*M. thaumasium*) foi submetido ao processo de ultrafiltração com o objetivo de eliminar partículas de massas maiores, para isso foi utilizado a membrana de poliétersulfona (Milipore) de cut-off de 3 kDa. O teste de atividade nematocida foi realizado utilizando apenas a amostra referente à porção do permeado (permeado1, fração que possui compostos com massas menores que 3,0 kDa). O efeito nematocida dessa amostra foi avaliado em *M. javanica* após 24h de tratamento a 28°C, com base na movimentação dos juvenis observada em microscópio óptico. Para certificar-se que os juvenis paralisados estavam mortos foi adicionado NaOH a 0,1N, como proposto por Chen & Dickson (2000). O mesmo fracionamento e teste nematocida foram conduzidos para o extrato 2 (farelo de trigo) e foi obtido o permeado 2.

### **2.5.2 Precipitação com acetona e ensaio de atividade nematicida**

A amostra referente à porção do permeado 1 foi precipitada com acetona na proporção 6:1 (acetona gelada: amostra) e a solução mantida overnight a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após esse período a solução foi centrifugada a 10000 g por 30 min, resultando na fração solúvel em acetona e no precipitado (FUKUTOMI et al., 2005; FUJITA et al., 2007). O segundo foi lavado duas vezes com acetona gelada e em seguida, ressuspendido em água. Essa amostra foi utilizada para o teste nematicida com *M. javanica*, como no item 2.4. Para certificar-se que os juvenis paralisados estavam mortos foi adicionado NaOH a 0,1N, como proposto por Chen & Dickson (2000). O mesmo procedimento e teste nematicida foram realizados para o permeado 2 (farelo de trigo).

### **2.5.3 Precipitação em meio básico e ensaio de atividade nematicida**

A porção solúvel em acetona referente ao permeado 1 foi basificada até pH 11 e posteriormente foi centrifugada a 10000 g por 30 min. O precipitado foi recuperado e mantido em temperatura ambiente para garantir evaporação total de acetona e em seguida, foi ressuspendido com água. O pH da amostra foi corrigido para 7 para evitar interferências no teste nematicida que foi realizado com *M. javanica* por 24 h a  $28^{\circ}\text{C}$ , como no item 2.4. Para certificar-se que os juvenis paralisados estavam mortos foi adicionado NaOH a 0,1N, como proposto por Chen & Dickson (2000). O mesmo procedimento foi realizado para a amostra do permeado 2 (farelo de trigo) a partir de sua fração solúvel em acetona e posteriormente o teste de atividade nematicida.

Para amostra referente ao tratamento testemunha foi preparada solução de acetona e água (6:1), que foi mantida em estufa até secar e em seguida 1000  $\mu\text{L}$  de água foram adicionados ao tubo. A amostra obtida foi basificada até pH 11 e depois corrigido para pH 7. Esses procedimentos são iguais aos realizados nas frações solúveis em acetona para garantir a não interferência da metodologia e dos reagentes no teste nematicida.

### **2.5.4 Extração em fase sólida (SPE-Fase Normal) e ensaio de atividade nematicida**

A amostra obtida da alcalinização, referente ao extrato1, foi submetida à extração em fase sólida utilizando-se cartuchos de sílica de fase normal. Para o preparo do cartucho, esse

foi equilibrado com 500 µL de acetona por três vezes, em seguida a amostra diluída em acetona (2X) foi aplicada, para retenção de compostos mais polares. Foi efetuada uma lavagem com acetona para eliminar compostos que interagiram parcialmente com a fase estacionária. Posteriormente, iniciou-se o processo de eluição com gradiente crescente de água. As frações foram eluídas inicialmente com 100% acetonitrila e 0% de água até a sexta fração que foi eluída apenas com água. Com a eluição foram obtidas as seguintes frações: F100, F80, F60, F40, F20 e F0 (o número corresponde à porcentagem de acetonitrila). As frações de 200 µL foram mantidas em estufa a 50°C até secar e depois ressuspendidas com 60 µL de água.

As amostras referentes às frações foram utilizadas para os testes nematocidas, como no item 2.4, e após 24 h foi avaliada a movimentação dos juvenis. O mesmo procedimento foi efetuado para amostra obtida após a precipitação em meio básico, referente ao tratamento testemunha (somente farelo de trigo).

## **2.6 Teste colorimétrico para compostos fenólicos**

As amostras foram avaliadas quanto à presença de compostos fenólicos por meio de análise qualitativa. A reação pelo método do Azul da Prússia foi constituída de 10 µL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  100 mM preparado em HCl 100 mM, 10 µL de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  8 mM preparado em água e 10 µL de amostra. O aparecimento da cor azul indica positivo para a presença de compostos fenólicos (PRICE & BUTLER, 1977).

## **2.7 Análise por espectrometria de massas da fração com atividade nematocida**

A fração obtida da SPE que apresentou atividade nematocida foi analisada por espectrometria de massas para identificar o composto responsável pelo efeito. A fração foi injetada no sistema LC/MS-MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se a coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min, acoplada a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent), operado no modo positivo. Os valores de m/z para as moléculas observadas bem como suas fragmentações foram utilizadas para pesquisas no banco de dados de espectros MassBank ([www.massbank.jp](http://www.massbank.jp)) para identificar compostos

presentes nos extratos. O mesmo procedimento foi realizado para as frações obtidas da amostra referente ao tratamento testemunha (somente farelo de trigo).

## **2.8 Teste de atividade nematicida com compostos puros**

O teste nematicida foi realizado em tubos eppendorfs contendo 20 juvenis de segundo estágio de *M. javanica* e diferentes concentrações (1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL) de valina foram testadas. Os tubos foram mantidos por 72h a 28°C e em seguida, com o auxílio de microscópio óptico foi verificado o índice de sobrevivência dos nematoides avaliando a movimentação. Do mesmo modo efetuado anteriormente, o teste de atividade nematicida foi realizado utilizando-se a betaína glicina. A mistura desses compostos também foi aplicada em teste nematicida, mantendo as concentrações citadas acima.

## **2.9 Confirmação do efeito nematicida dos extratos**

Os testes nematicidas com extrato fúngico e extrato do farelo de trigo foram repetidos como citado no item 2.4. Para o controle foram preparados tubos eppendorfs com apenas o extrato do farelo de trigo ou com o extrato bruto do fungo. Testes nematicidas utilizando juvenis tratados com antibiótico foram realizados também. O procedimento de desinfestação dos juvenis consistiu de três lavagens por 20 min com solução de ampicilina (200ppm), solução de cloranfenicol (300ppm) e uma lavagem com água estéril. Após o intervalo de cada lavagem, os tubos foram centrifugados a 1750 rpm e descartou-se parte da solução. Os procedimentos foram realizados em ambiente estéril.

As seguintes amostras obtidas foram plaqueadas em placas de Petri com meio BDA e incubadas a 4°C e 28°C: extrato fúngico, extrato farelo de trigo, extrato fúngico do tubo que continha nematoide, extrato fúngico do tubo que continha nematoide desinfestado, extrato farelo de trigo do tubo que continha nematoide e extrato farelo de trigo do tubo que continha nematoide desinfestado.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação do efeito nematicida a partir do extrato bruto de *Monacrosporium thaumasium*

O ensaio realizado com o extrato bruto de *M.thaumasium* apresentou mortalidade de 100% do número de juvenis de *M. javanica* em 24 h (**Figura1**). Esse resultado ocorreu nos tratamentos sem ferver, fervido por 30 min e aquecido até secar. Enquanto o controle constituído de água não houve mortalidade. Desta forma, o extrato bruto poderia possuir algum agente nematicida de alta eficiência e termoestável, pois mesmo após a fervura a atividade nematicida foi mantida.

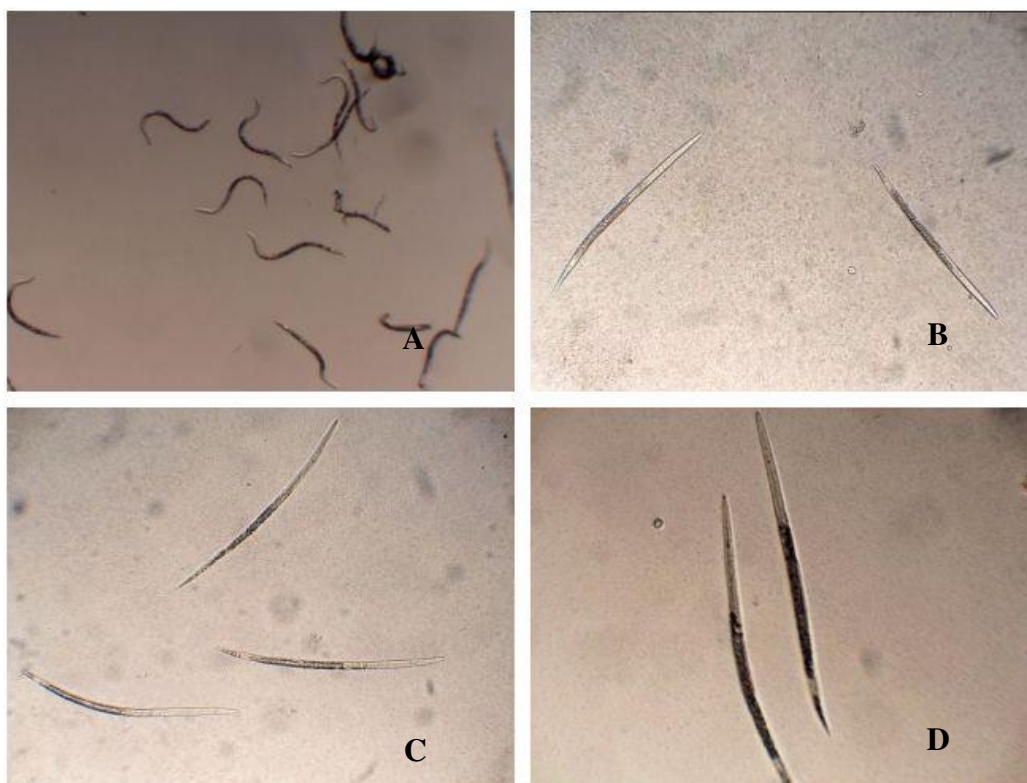


Figura 2: Teste nematicida realizado com *M. javanica* após 24 h. (A) Controle com água; (B) Extrato bruto de *M.thaumasium* sem ferver; (C) Extrato bruto de *M.thaumasium* fervido por 30 min; (D) Extrato bruto de *M.thaumasium* fervido até secar. B, C e D apresentam os nematoides em posição de morte.

Após a confirmação do efeito nematicida do extrato bruto do fungo foi efetuada a etapa de ultrafiltração. A amostra do permeado foi utilizada no teste nematicida e, com 24h, houve mortalidade de 100% dos juvenis de *M.javanica*. Sugerindo-se a presença de moléculas de baixo peso molecular com atividade nematicida.

A amostra da filtração com membrana de cut-off de 3,0 kDa poderiam conter peptídeo bioativos. Desta forma, foi efetuada uma precipitação com acetona que resultou na formação do precipitado (parte peptídica) e na fração solúvel em acetona. A amostra referente ao precipitado foi utilizada no teste nematocida e não provocou mortalidade dos juvenis no intervalo de 72h. Desse modo, a fração solúvel em acetona deveria conter o composto responsável pelo efeito nematocida detectado anteriormente.

Compostos fenólicos podem ser produzidos por microrganismos e terem atividade nematocida (LI et al., 2007; BOGNER et al., 2017). Assim, fração solúvel em acetona foi avaliada quanto à presença de compostos fenólicos por meio do teste colorimétrico Azul da Prússia. Ao efetuar esse ensaio a amostra ficou azul indicando a presença de compostos fenólicos.

Devido à possibilidade de presença de compostos fenólicos, o fracionamento prosseguiu com a fração solúvel em acetona. A alcalinização de solução em acetona que contenha compostos fenólicos pode resultar na precipitação desses, logo a fração solúvel em acetona foi alcalinizada e resultou em precipitado e sobrenadante. O precipitado foi solubilizado com água (pH corrigido para 7) e foi utilizado nos testes nematocidas. A redução de 100 % no número de *M. javanica* foi observada após 24h de incubação. O controle preparado como citado no item 2.5.3 não teve efeito sobre os nematoides, visto que a movimentação dos juvenis tratados era igual ao dos juvenis tratados com apenas água. Confirmando-se que os reagentes e a metodologia adotada para o fracionamento da amostra não interferiram no teste nematocida. O teste colorimétrico foi realizado para a nova fração (precipitado) e apresentou resultado positivo para compostos fenólicos.

A amostra obtida da precipitação em meio alcalino foi novamente fracionada utilizando-se cartuchos de fase normal. Nessa etapa, foram obtidas as seguintes frações: F100, F80, F60, F40, F20, F10 e F0, que foram utilizadas para o teste nematocida e para o teste colorimétrico Azul da Prússia. Apenas a F40 apresentou efeito nematocida (**Figura 3**), pois mesmo após a adição de NaOH não houve movimentos dos juvenis. Essa foi a única fração que apresentou resultado positivo para o teste colorimétrico, sugerindo-se a presença de composto fenólico.

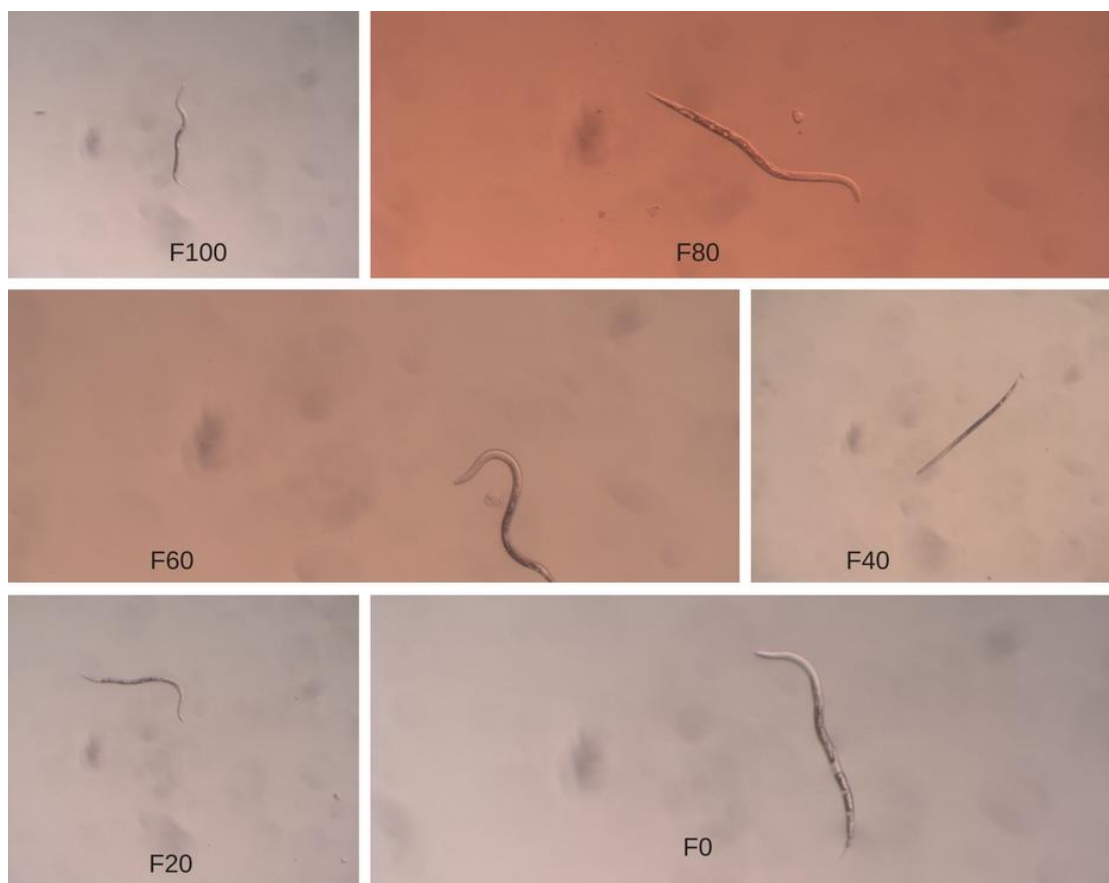


Figura 3: Teste nematocida utilizando-se as frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto de *M. thaumasium* em SPE. F100, F80, F60, F40, F20, F10 e F0 referem-se às frações as quais o número indica a porcentagem de acetonitrila utilizada para a eluição dos compostos. F40 apresenta os juvenis em posição de morte.

### 3.2 Análise por espectrometria de massas da fração com atividade nematocida referente ao extrato bruto de *M. thaumasium*

A fração 40 foi analisada por LC/MS-MS e essa continha várias massas de baixo peso molecular, indicando que a amostra não estava pura. Desse modo, as massas de maiores intensidades ( $m/z$  104, 140, 118, 203, 217 e 226) foram selecionadas e fragmentadas. Os fragmentos dessas massas, a partir de comparação com espectros de banco de dados, permitiram sugerir alguns compostos presentes na amostra (**Tabela 1**). Alguns  $m/z$  detectados não apresentaram semelhança de fragmentação com nenhum composto do banco de dados.

Tabela 1: Informações obtidas com a espectrometria de massas da Fração 40 do extrato de *M.thaumasium*.

MS m/z (+)	Tempo de retenção	MS/MS m/z ES (+)	Composto similar	MS/MS m/z (Banco de dados)	Massa molecular
118	0,588	57,8 59,1	Betaína glicina	58,1 59,2	117,07
118	1,127	58,2 55,1 71,9 57,1 59,3 56,3	Valina	58,1 55,2 72,1 57,2 59,3 56,2	117,07
217	0,440	114,9 71,0 72,8 115,7 116,3 98,9 55,3 175,0	Não identificado		
203	0,424	101,2 103,2 61,3 115,1 100,6 145,1 82,7	Ácido 2-naftoxiacético	101,03 103,5 115,05 145,1	202,063
104	0,612	58,1 59,1 60,1 103,9	Colina	58,2 59,2 60,2 104,1	104,17
140	0,604	95,7 80,7 53,2 139,8 58,4	Não identificado		

226	1,119	82	Não identificado
		150,3	
		122,3	
		83,6	
		87,2	
		93,7	

### 3.3 Avaliação do efeito nematicida de compostos puros

Na literatura, existem relatos sobre o efeito nematicida de aminoácidos em fitonematoides. Segundo Oliveira et. al (2009), a valina (1.000 µg/ml) possui um pequeno efeito nematicida em juvenis de *Meloidogyne exigua* provocando uma redução 11,6%. Osman & Viglierchio (1980) testaram a valina na forma de spray foliar e verificaram a redução do número de galhas e de ovos de *M. incognita* quando se realizava esse tratamento. Amdadul Hoque et al. (2014) também testaram esse aminoácido em diferentes concentrações para *M. javanica* e para a maior concentração de valina (400 µg/ml) houve redução de aproximadamente 20% no número de juvenis.

A valina foi um dos compostos identificados na fração 40 (**Tabela 1**), por isso o teste nematicida foi conduzido com esse aminoácido em diferentes concentrações (1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL). No entanto, não houve redução do número de juvenis de *M. javanica* após 72h de tratamento. Sugerindo-se que somente a ação da valina não é responsável pela mortalidade dos juvenis que se observou na fração 40.

Na busca por novas alternativas para o controle de fitonematoides, extratos de algas marinhas vêm sendo utilizados na agricultura devido ao seu caráter nematicida. Wu et al. (1998) utilizaram um produto comercial constituído da alga *Ascophyllum nodosum* e foi confirmada sua eficiência na redução do número de fêmeas e ovos de *M. javanica* quando aplicado nas plantas. É descrito a presença de betaínas no extrato dessa alga, logo foi verificado se as reduções dos fitonematoides estavam relacionadas com a betaína  $\gamma$  ácido aminobutírico, betaína ácido  $\delta$  aminoaléico e betaína glicina. Esses compostos reduziram também o número de fêmeas e de ovos de *M. javanica*, o que permitiu concluir que o conjunto de betaínas está relacionado com o efeito nematicida do extrato de alga. No entanto, como essas moléculas induzem a redução de fitonematoides ainda não é descrito.

Sobre o efeito de betaína glicina em juvenis não existe informações, desse modo o teste nematicida foi realizado com esse composto em diferentes concentrações (1000, 500 e 100 µg/mL) visto que foi identificado na fração 40 (**Tabela 1**). No entanto, não ocorreu a paralisação dos juvenis em nenhum tratamento, após 72h. Indicando que esse composto não é responsável pela atividade nematicida da fração 40.

Um estudo sobre a relação da betaína com o sistema nervoso de *Caenorhabditis elegans* indicou que esse nematoide possui transportador de betaína glicina (SNF-3) e receptor de betaína glicina (ACR-23). O transportador confere resistência ao excesso de betaína extracelular e dificilmente esse composto terá uma ação de paralisação, apenas pode reduzir a movimentação do nematoide no caso de altas concentrações extracelulares. Esse nematoide utilizado no estudo é considerado um organismo modelo, logo existe a chance de fitonematoídeos também possuírem o transportador e o receptor de betaína, o que poderia explicar a não paralisação dos juvenis no teste quando se utilizou betaína (PEDEN et al., 2013).

Uma solução composta por valina e betaína foi preparada para o teste nematicida, visto que a fração 40 pode conter os dois compostos. No entanto, não foi observado nenhum efeito nos juvenis provocado por esse tratamento, mesmo em concentrações mais altas (1000 µg/mL) após 72h de tratamento.

### **3.4 Avaliação do efeito nematicida de extrato de farelo de trigo**

Com os ensaios realizados não foi possível identificar o composto com atividade nematicida, porém alguns compostos como betaína, colina e valina foram identificados e esses são constituintes do farelo de trigo (DUARTE & ARECO, 2002; ZEISEL et al., 2003). Esse substrato foi utilizado para o cultivo do fungo, logo surgiu a hipótese de que a molécula responsável pela atividade nematicida poderia estar presente no farelo de trigo. Assim as etapas de fracionamento realizadas para o extrato bruto de *M. thaumasium* foram efetuadas para o extrato obtido apenas do meio de cultura (farelo de trigo mais solução de minerais).

O ensaio nematicida com o extrato do farelo de trigo apresentou redução de 100% do número de juvenis de *M. javanica* com 17 h de tratamento. Esses resultados ocorreram quando se utilizou o extrato sem ferver, fervido por 30 min e aquecido até secar. Os resultados foram iguais aos obtidos pelo extrato bruto de *M. thaumasium*.

O extrato do farelo de trigo foi submetido ao processo de ultrafiltração e com amostra do permeado foi realizado o teste nematicida. Com 24h o permeado provocou mortalidade de 100% dos juvenis *M. javanica*.

A amostra do permeado foi utilizada para a precipitação com acetona e resultou no precipitado (fração peptídica) e na fração solúvel em acetona. A amostra referente ao precipitado reduziu em 100% o número de *M. javanica*. Porém, para a continuidade dos testes foi utilizado à fração solúvel em acetona para seguir a mesma metodologia utilizada para o extrato bruto do fungo.

A fração solúvel em acetona foi alcalinizada e obteve-se o precipitado que apresentou potencial de redução de *M. javanica*, visto que com 24h de incubação 100% dos nematoides estavam mortos.

O precipitado obtido na etapa anterior foi fracionado utilizando-se o cartucho de fase normal e resultou em seis frações que foram aplicadas no teste nematicida e no teste colorimétrico Azul da Prússia. Apenas a F20 e F40 apresentaram efeito nematicida (**Figura 4**). Após a adição de NaOH os nematoides não realizaram movimentos confirmando-se o efeito nematicida dessas frações. Somente essas frações resultaram em positivo para a presença de compostos fenólicos, após o teste colorimétrico.

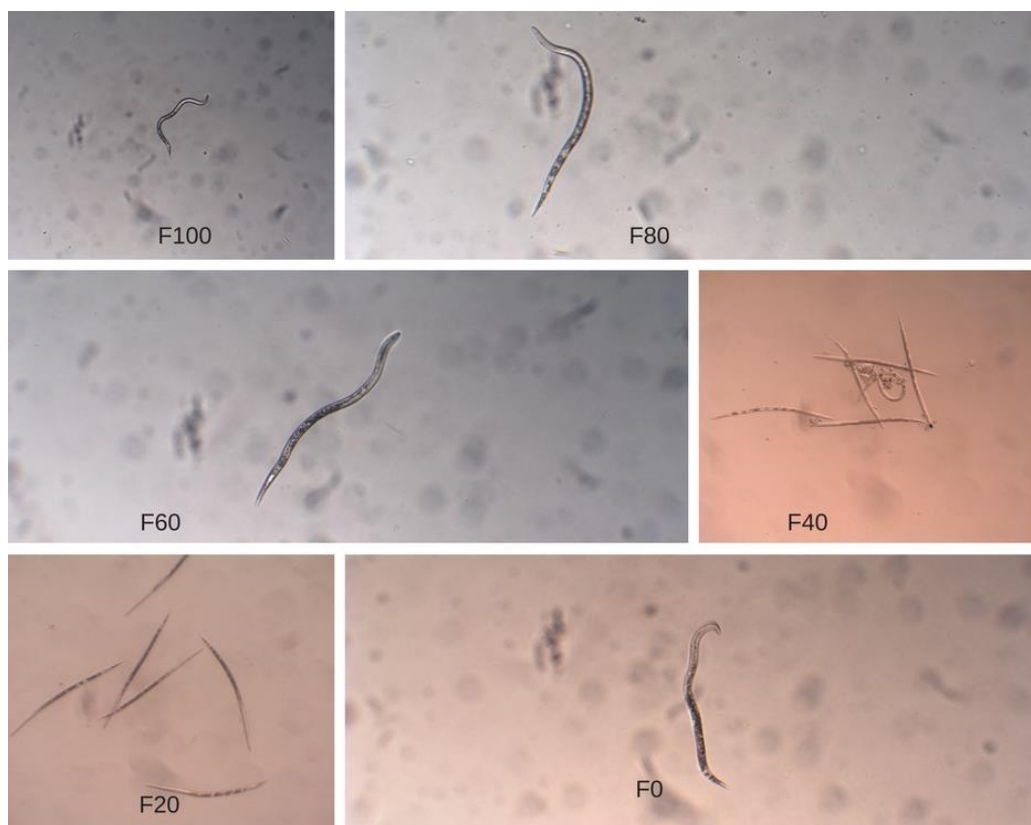


Figura 4: Teste de ação nematocida utilizando-se as frações obtidas a partir do fracionamento do extrato farelo de trigo em SPE. F100, F80, F60, F40, F20, F10 e F0 referem-se às frações as quais o número indica a porcentagem de acetonitrila utilizada para a eluição dos compostos. F40 e F20 apresentam os juvenis em posição de morte.

### 3.5 Análise por espectrometria de massas da fração com atividade nematocida referente ao extrato do farelo de trigo

As frações 20 e 40 foram analisadas por LC/MS-MS e são constituídas de várias massas de baixo peso molecular, indicando que ainda existiam muitos compostos nas amostras. Deste modo, as massas que apresentavam maior intensidade foram selecionadas para fragmentá-las. Com os dados de fragmentações, o banco de dados forneceu vários compostos que apresentavam características similares. Alguns compostos identificados são apresentados na **Tabela 2** (fração 40) e **Tabela 3** (fração 20). Houve m/z detectados que não apresentaram semelhança com nenhum composto do banco de dados.

Tabela 2: Informações obtidas com a espectrometria de massas da Fração 40 do extrato de farelo de trigo

MS m/z (+)	Tempo de retenção	MS/MS m/z ES (+)	Composto similar	MS/MS m/z (Banco de dados)	Massa molecular
118	0,588	58,1 59,2	Betaína glicina	58,1 59,2	117,07
118	1,127	57,9 55,1 72,2 57,1 59,1 56,2	Valina	58,1 55,2 72,1 57,2 59,3 56,2	117,07
217	0,473	54,8 99,0 71,7 114,6 141,0 72,5	Não identificado		
203	0,456	83,1 115,0 102,6 85,0 73,2	Não identificado		
104	0,612	58,1 59,1 60,1	Colina	58,2 59,2 60,2	104,17
140	0,669	80,7 92,2 53,1 108,3 136,8	Não identificado		
226	1,119	82,2 81,0 87,0	Ciprodinil	67,0 79,05 81,06	225,295

95,3	82,06
85,9	226,1391
226,0	
67,0	
150,0	
79,1	
184,4	

---

Tabela 3: Informações obtidas com a espectrometria de massas da Fração 20 do extrato de farelo de trigo

MS m/z (+)	Tempo de retenção	MS/MS m/z ES (+)	Composto similar	MS/MS m/z (Banco de dados)	Massa molecular
118	0,653	58,1 59,2	Betaína glicina	58,1 59,2	117,07
118	1,094	58,2 72,1	Não identificado		
217	0,473	99,0 54,8 71,0 157,3 114,9	Não identificado		
203	0,456	100,9 83,0 102,8 144,9 61,0 59,1 58,6 109,8	Ácido 2-naftoxiacético	59,1 101,036 103,0 145,06	202,063
104	0,652	60,1 58,1 69,1 87,2	Não identificado		
140	0,669	96,2 53,1 81,2 58,0 95,6 68,7	Tropinona	53,2 58,3 81,1 95,9	139,09
226	1,119	82,2 81,0 87,0 95,3	Ciprodinil	82,06 93,05 95,04 226,1391	225,295

85,9  
226,0  
67,0  
150,0  
79,1  
184,4

Com a análise dos dois extratos é possível resumir os resultados dos testes nematocidas (**Tabela 4**). Esses são muito similares indicando que os efeitos nematocidas encontrados nas frações provavelmente são de compostos oriundos do farelo de trigo e não resultado de algum composto do metabolismo fúngico.

Tabela 4: Resultados dos testes nematocidas realizados com as amostras das etapas de fracionamento

<b>Etapas de fracionamento</b>	<b>% de mortalidade de <i>M.javanica</i> com o extrato <i>M.thaumasium</i></b>	<b>% de mortalidade de <i>M.javanica</i> com o extrato de farelo de trigo</b>
Extrato bruto	100 %	100%
Permeado (ultrafiltração)	100%	100%
Precipitado (precipitação com acetona)	0%	100%
Precipitado (precipitação em meio alcalino)	100%	100%
Frações (SPE)	F40- 100%	F20 e F40- 100%

O farelo de trigo possui compostos fenólicos como ácido ferúlico e gálico (YUAN et al., 2005; KUMAR & PRUTHI, 2014; LADDOMADA et al., 2015) e na literatura existem relatos sobre o efeito nematocida desses compostos. O ácido ferúlico foi eficiente na redução do número de juvenis de *M. javanica* (SHAZAUKAT et al., 2003). Enquanto o ácido gálico 1% (p/v) reduziu o número de juvenis de *M. incognita* em 75% com 24h de tratamento (SULTANA et al., 2014). No entanto, nas frações identificadas com atividade nematocida esses compostos não foram detectados.

Talvez os íons não identificados nas análises por LC/MS-MS possam ser responsáveis pelo efeito nematocida verificado nas frações. O m/z 217 seria um bom alvo para purificações futuras visto que se encontra nas três frações que obtiveram resultados positivos nos testes nematocidas, os valores de m/z referentes às fragmentações são iguais nas frações e o tempo

de retenção muito próximo, indicando que pode ser o mesmo composto presente nas três frações.

O valor de  $m/z$  217 pode corresponder ao ácido ferúlico, uma vez que a interação desse ácido com o íon sódio ( $\text{Na}^+$ ) pode resultar nesse íon detectado. (WAKSMUNDZKA-HAJNOS & SHERMA, 2010; GALLAGE et al., 2014). Esse ácido está presente no farelo de trigo (YUAN et al., 2005), é classificado como composto fenólico (LADDOMADA et al., 2015) e apresenta efeito nematicida (SHAZAUKAT et al., 2003). Esses dados contribuem para a sugestão do composto referente ao  $m/z$  217, pois os extratos foram obtidos de farelo de trigo, as frações possuíam efeito nematicida e existia a possibilidade compostos fenólicos nessas.

Com essa sugestão para o  $m/z$  217 e como não foram identificadas massas específicas para as frações fúngicas provavelmente, com a metodologia adotada, o composto nematicida fracionado é de origem do farelo de trigo.

### **3.6 Confirmação do efeito nematicida dos extratos**

O efeito nematicida do extrato do farelo de trigo estimulou novas investigações visto que seria o primeiro relato sobre o efeito desse extrato. Para isso os testes nematicidas foram repetidos quatro vezes utilizando o extrato bruto fúngico e o extrato do farelo de trigo. Foi observado que os meios que continham os fitonematoides, após 24 h de incubação a  $28^\circ\text{C}$  tornavam-se turvos e os tubos que continham somente os extratos (controles), após esse período, não ocorriam mudanças no meio. Com essa observação surgiu à hipótese que existia contaminação por bactéria no tubo que continha nematoide e extrato.

Desse modo, as amostras dos testes de ação nematicida, extrato fúngico e extrato de farelo de trigo foram plaqueadas. Após 24 h, as amostras referentes somente aos extratos não tiveram crescimento de microrganismos nas duas temperaturas utilizadas. Mas para as amostras obtidas dos testes de ação nematicida houve um intenso crescimento bacteriano a  $28^\circ\text{C}$  e a  $4^\circ\text{C}$  não houve. Desse modo, ao realizar os testes nematicidas, empregando os extratos brutos, ocorria a multiplicação de bactérias, sendo o extrato favorável a esse crescimento devido sua composição rica em carboidratos. Portanto, a redução do número dos juvenis pode ser também em consequência do crescimento bacteriano.

Com essa análise, constatou-se que as bactérias provavelmente estavam presentes na suspensão de fitonematoides e isto é possível já que esse patógeno foi obtido de raízes de

tomateiro que permaneceram em casa-de-vegetação sem estar em ambiente estéril. A suspensão de juvenis foi desinfestada utilizando ampicilina e cloranfenicol e novamente foram realizados os testes de ação nematicida, mas ainda houve crescimento bacteriano nos extratos. As bactérias podem ficar retidas em orifícios do nematoide e quando encontram meio rico em nutriente se desenvolvem intensamente. Portanto, os ensaios de ação nematicida realizados com os extratos brutos que apresentavam mortalidade de 100% dos juvenis provavelmente eram devido à contaminação também, e não somente ao efeito do extrato.

Por outro lado, as atividades nematicidas observadas nas amostras referentes às etapas de fracionamento, principalmente a etapa utilizando a SPE, são devido a moléculas presentes nessas amostras. Visto que não foi observado turbidez das amostras durante o ensaio nematicida, pois provavelmente nessa etapa as amostras não possuíam nutrientes suficientes para promover o crescimento bacteriano.

#### 4. CONCLUSÕES

A estratégia de fracionamento utilizada gerou subfrações que possuíam compostos com atividade nematicida, que reduziram em 100% o número de juvenis de *M. javanica*, tanto para os extratos obtidos na presença quanto na ausência do fungo. O perfil de massas das frações foi muito similares o que permitiu sugerir que o composto com atividade nematicida seja de origem do farelo de trigo. Além do mais, não foi possível identificar íons específicos da fração do extrato de *M. thaumasium*. Alguns íons não foram identificados, como o m/z 217 que seria um bom alvo de investigação, pois está presente em todas as frações obtidas da SPE que provocaram a mortalidade dos fitonematoides e existe a possibilidade desse íon corresponder ao ácido ferúlico.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMDADUL HOQUE, A. K. M.; REJWAN BHUIYAN, M.; ASHIK IQBAL KHAN, M.; MAHMUD, A.; UDDIN AHMAD, M. Effect of amino acids on root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infecting tomato plant. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, v. 47, p. 1921-1928, 2014.

ARAÚJO, J. V.; LURDES, M. L. A.; SILVA, W. W.; VIEIRA, L. S. Biological control of gastrointestinal nematodes of goats in semiarid climate by *Monacrosporium thaumasium*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.48, p. 1177-1181, 2007.

BENNETT, J. W. & BENTLEY, R. What's in a name? Microbial secondary metabolism. Advances in Applied Microbiology, v. 34, p. 1-28, 1989.

BOGNER, C. W.; KAMDEM, R. S. T.; SICHTERMANN, G.; MATTHÄUS, C.; HÖLSCHER, D.; POPP, J.; PROKSCH, P.; GRUNDLER, F. M. W.; SCHOUTEN, A. Bioactive secondary metabolites with multiple activities from a fungal endophyte. Microbial Biotechnology, v. 10, p. 175-188, 2017.

BONETTI, J. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, p. 553, 1981.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. Nature Reviews Microbiology, v. 11, p. 21-32, 2013.

BÜCHEL, E.; MARTINI, U.; MAYER, A.; ANKE, H.; STERNER, O. Omphalotins B, C and D, nematicidal cyclopeptides from *Omphalotus olearius* absolute configuration of omphalotin A. Tetrahedron, v.54, p. 5345-5352, 1998.

CHEN, S.Y. & DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, v. 32, p.117-121, 2000.

DEGENKOLB, T. & VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I:

metabolites from nematophagous ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.100, p. 3799-3812, 2016.

DUARTE, J.M. & ARECO, K.C.N. Escola Paulista de Medicina. Departamento de Informática em Saúde. Tabela de composição Química dos Alimentos (TABNUT). Disponível em: <http://tabnut.dis.epm.br/alimento/20077/farelo-de-trigo-cru>. Acesso 06 Jul 2016.

FUJITA, K.; ICHIMASA, S.; ZENDO, T.; KOGA, S.; YONEYAMA, F.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 2871-2877, 2007.

FUKUTOMI, T.; KODERA, Y.; KOGO, T.; FURUDATE, S.; OMORI, A.; MAEDA, T. A simple method for peptide purification as a basis for peptidome analysis. p. 15-21, 2005.

GALLAGE, N. J.; HANSEN, E. H.; KANNANGARA, R.; OLSEN, C. E.; MOTAWIA, M. S.; JØRGENSEN, K.; HOLME, I.; HEBELSTRUP, K.; GRISONI, M.; MØLLER, B. L. Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nature Communications*, v. 5, p. 1-14, 2014.

HOFFMEISTER, D. & KELLER, N.P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 393-416, 2007.

HUANG, Z.; DAN, Y.; HUANG, Y.; LIN, L.; LI, T.; YE, W.; WIE, X. Sesquiterpenes from the mycelial cultures of *Dichomitus squalens*. *The Journal of Natural Products*, v.67, p. 2121-2123, 2004.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 937-947, 2005.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, v. 4, p. 86-93, 2014.

KHALDI, N.; SEIFUDDIN, T.F.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W.C.; WOLFE, K.H.; FEDOROVA, N.D. Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, p. 736-741, 2010.

LADDOMADA, B.; CARETTO, S.; MITA, G. Wheat bran phenolic acids: Bioavailability and stability in whole wheat-based foods. *Molecules*, v. 20, p. 15666-15685, 2015.

LIANG, L.; LIU, S.; YANG, J.; MENG, Z.; LEI, L.; ZHANG, K. Comparison of homology models and crystal structures of cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi: structural basis of nematicidal activity. *FASEB Journal*, v. 25, p. 1894-1902, 2011.

LI, G.; ZHANG, K.; XU, J.; DONG, J.; LIU, Y. Nematicidal Substances from Fungi. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 1, p. 212-233, 2007.

MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: How producer cells send out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 282-293, 2005.

NIU, X.; CHEN, L.; YUE, Q.; WANG, B.; ZHANG, J.; ZHU, C.; ZHANG, K.; BILLS, G.F.; AN, Z. Characterization of thermolide biosynthetic genes and a new thermolide from sister thermophilic fungi. *Organic Letters*, v. 16, p. 3744-3747, 2014.

PRICE, M. L. & BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 25, p. 1268-1273, 1977.

OLIVEIRA, D. F.; CARVALHO, H. W. P.; NUNES, A. S.; SILVA, G. H.; CAMPOS, V. P.; JÚNIOR, H. M. S.; CAVALHEIRO, A. J. The activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne exigua*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 124, p. 57-63, 2009.

OSMAN, A. A. & VIGLIERCHIO, D. R. Foliar Spray Effects of Selected Amino Acids on Sunflower Infected with *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, v. 13, p. 417-419, 1981.

SHAZAUKAT, S.S.; SIDDIQUI, I.A.; ALI, N.I.; ALI, S.A.; KHAN, G.H. Nematicidal and allelopathic responses of *Lantana camara* root extract. *Phytopathologia Mediterranea*, v.42, p. 71-78, 2003.

SOARES, F.E.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; LIMA, W.S.; MOZER, L.R.; QUEIROZ, J.H. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitology Research*, v. 110, p. 2423-2427, 2012.

SULTANA, N.; AKHTAR, M.; FERHEEN, S.; KAUSAR, R.; KHATOON, Z. Effect of different concentrations of *Eriobotrya japonica* extract on control of infection by *Meloidogyne incognita* and *Cephalobus litoralis*. *Journal of Entomology and Nematology*, v. 6, p. 27-31, 2014.

PEDEN, A.S.; MAC, P.; FEI, Y.J.; CASTRO, C.; JIANG, G.; MURFITT, K.J.; MISKA, E.A.; GRIFFIN, J.L.; GANAPATHY, V.; JORGENSEN, E.M. Betaine acts on a ligand-gated ion channel in the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Nature Neuroscience*, v.16, p. 1794-1801, 2013.

PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1-23, 2015.

WANG, R.B.; YANG, J.K.; LIN, C.; ZHANG, Y.; ZHANG, K.Q. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylellahizishanna*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 42, p. 589-594, 2006.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. & SHERMA, J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. CRC Press, v.102, p.503, 2010.

WANG, Y. L.; LI, L. F.; LI, D. X.; WANG, B.; ZHANG, K.; NIU, X. Yellow Pigment Aurovertins Mediate Interactions between the Pathogenic Fungus *Pochonia chlamydosporia*

and Its Nematode Host. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 6577-6587, 2015.

WU, Y.; JENKINS, T.; BLUNDEN, G.; VON MENDE, N.; HANKINS, S. D. Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, v. 10, p. 91-94, 1998.

YUAN, X.; WANG, J.; YAO, H. Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chemistry*, v. 90, p. 759-764, 2005.

ZEISEL, S. H.; MAR, M.-H.; HOWE, J. C.; HOLDEN, J. M. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *The Journal of nutrition*, v. 133, p. 1302-1307, 2003.

ZIEMERT, N.; PODELL, S.; PENN, K.; BADGER, J.H.; ALLEN, E.; JENSEN, P.R. The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A Phylogeny Based Bioinformatic Tool to Classify Secondary Metabolite Gene Diversity. *PLoS ONE*, v. 7, p. 1-9, 2012.

# Capítulo 2

Análise de extratos extracelulares de *Pochonia chlamydosporia*, agente de controle biológico de fitonematoides e promotor de crescimento vegetal

## RESUMO

GOUVEIA, Angélica de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Análise de extratos extracelulares de *Pochonia chlamydosporia*, agente de controle biológico de fitonematoides e promotor de crescimento vegetal.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Filipe Elias de Freitas Soares, Humberto Josué de Oliveira Ramos e Thalita Suelen Avelar Monteiro.

O fungo *Pochonia chlamydosporia* é uma alternativa para o controle biológico e a determinação dos mecanismos de ação pode ser importante para o aumento da atividade contra fitonematoides. Em adição, esses fungos podem ter também potencial para produção e secreção de agentes promotores de crescimento vegetal. Portanto, foram analisados os extratos extracelulares produzidos por oito isolados de *P. chlamydosporia*. Todos os isolados foram capazes de secretar proteases, porém diferiram na atividade proteolítica. Nestas condições de fermentação o isolado PC-40 apresentou elevadas abundâncias relativas para as proteases subtilisina like e carboxipeptidase e para uma glucana  $\beta$ -1,3 glicosidase. Os extratos apresentaram atividade de fosfatases e essas podem estar envolvidas na liberação de fosfato de fontes orgânicas. Os isolados tiveram a capacidade de solubilizar fosfato tricálcio, no entanto a quantidade de fosfato liberado foi diferente entre os isolados. O isolado PC-35 foi o que mais liberou fosfato em condições *in vitro*. A solubilização de fontes inorgânicas de fosfato ocorre pela liberação de ácidos orgânicos pelo microrganismo e no extrato referente à fermentação do PC-10 foram detectados os ácidos: acético, propiônico e cítrico. O crescimento fúngico aumentou a concentração de ácido indol acético no meio de cultivo, determinado por LC/MS-MS para os isolados PC-10 e PC-46, indicando a capacidade de biossíntese desse fitohormônio. Desse modo, o *P. chlamydosporia* além de ser eficiente no controle biológico de fitonematoides, pode possuir grande potencial como promotor do crescimento das plantas, de modo indireto liberando fosfato para assimilação pela planta e de modo direto podendo aumentar o crescimento devido à produção de auxina.

Palavras chave: *Pochonia chlamydosporia*, protease, solubilização de fosfato e auxina.

## ABSTRACT

GOUVEIA, Angélica de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Analysis of extracellular extracts from *Pochonia chlamydosporia*, a phytonematode biological control agent and plant growth promoter.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisers: Filippe Elias de Freitas Soares, Humberto Josué de Oliveira Ramos and Thalita Suelen Avelar Monteiro.

The fungus *Pochonia chlamydosporia* is an alternative for biological control and the determination of the mechanisms of action may be important for the increase in activity against phytonematodes. In addition, such fungi may also have potential for production and secretion of plant growth promoting agents. Therefore, the extracellular extracts produced by eight *P. chlamydosporia* isolates were analysed. All isolates were able to secrete proteases, but they differed in proteolytic activity. In these fermentation conditions the PC-40 isolate presented high relative activities for the proteases subtilisin and carboxypeptidase and for a glucan  $\beta$ -1,3 glucosidase. The extracts presented phosphatase activity, and these may be involved in the released of phosphate from organic sources. The isolates had the ability to solubilise tricalcium phosphate, however the amount of phosphate released was different among the isolates. The PC-35 isolate was the one that released the most phosphate under in vitro conditions. The solubilisation of inorganic sources of phosphate occurs by the release of organic acids by the microorganism and in the extract related to the fermentation of PC-10. The acids were detected: acetic, propionic and citric. Fungal growth increased the concentration of indole acetic acid in the culture medium as determined by LC/MS-MS for the isolates PC-10 and PC-46, indicating the biosynthesis capacity of this phytohormone. Besides *P. chlamydosporia* being efficient in the biological control of phytonematodes, it also may have great potential as a promoter of plant growth, indirectly releasing phosphate for assimilation by the plant and in a direct way, increasing growth due to the production of auxin.

Keywords: *Pochonia chlamydosporia*, protease, solubilisation of phosphate and auxin.

## 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos podem favorecer o crescimento das plantas, como por exemplo, por meio da produção de hormônios, da disponibilização de nutrientes e da proteção contra patógenos como fitonematoides. O fungo *Pochonia chlamydosporia* se destaca por estar envolvido nesses processos, uma vez que é capaz de associar a superfície e colonizar o interior de raízes de diversas espécies de plantas promovendo esses benefícios (MORTON et al., 2003; MACIÁ-VICENTE et al., 2009; DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2012). *P. chlamydosporia* é um fungo nematófago que coloniza massa de ovos de nematoides que parasitam plantas, sendo as proteases fundamentais no processo inicial de infecção, as quais proporcionam danos na barreira de proteção, facilitando o acesso do fungo ao interior do ovo. Esse fungo já é utilizado comercialmente para o manejo dessas doenças e tem sido uma alternativa de destaque com base na sua eficiência e seu caráter sustentável (VERDEJO-LUCAS et al., 2003; MUTHULAKSHMI et al., 2012). Além de agir como parasita de ovos de fitonematoides, *P. chlamydosporia* tem a capacidade de promover crescimento vegetal, que foi evidenciado para diferentes espécies vegetais como banana, cenoura, alface, trigo e tomate (MONFORT et al., 2005; MACIÁ-VICENTE et al., 2009; ROSSO et al., 2014; BONTEMPO et al., 2014; ZAVALA-GONZALEZ et al., 2015; DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2015; SILVA, 2016). Os fatores responsáveis pelo aumento do crescimento vegetativo ainda não são muito evidentes, desse modo, pesquisas têm avançado para compreender melhor esse processo. Estudos demonstram que esse fungo é capaz de solubilizar fosfato e é apto à produção de hormônio auxina, fatores importantes no desenvolvimento do vegetal (ZAVALA-GONZALEZ et al., 2015).

*Pochonia chlamydosporia* é um fungo cosmopolita, porém pouco é conhecido sobre a diversidade genética natural ou agro-ecossistêmica dos isolados. Esse microrganismo pode ser isolado de nematoides de galhas ou de cistos, e sua origem reflete na sequência de aminoácidos da protease VCPI e na preferência pelo hospedeiro. Além disso, a eficiência no controle biológico de fitonematoides pode ser influenciada por outros fatores como solo (MORTON et al., 2003; MAUCLINE et al., 2004; NASU, 2013). O isolado de *P. chlamydosporia* 60 é mais efetivo no controle de *Meloidogyne hapla* em solo constituído de argila e areia do que em solo rico em minerais e em matéria orgânica (SIDDIQUI et al., 2009).

Existe variação na eficácia do controle biológico de fitonematoides quando se utiliza diferentes isolados de *P. chlamydosporia* (DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2012). Todavia estudos avaliando diferentes isolados desse fungo sobre a produção de enzimas e variáveis relacionadas ao melhor desenvolvimento das plantas são escassos. Desse modo, o presente trabalho avaliou a produção de protease e fosfatase, enzimas relacionadas ao controle biológico e mineralização de fosfato, respectivamente. Assim como a solubilização de fosfato e produção de auxina por diferentes isolados, uma vez que esses processos podem ser responsáveis pela promoção de crescimento observada em diferentes culturas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Avaliação do extrato de *Pochonia chlamydosporia* PC-10

Para a obtenção do extrato bruto cultivou-se o isolado PC-10 de *P. chlamydosporia* em arroz durante 21 dias a 26 °C. Após esse período, 20 g de arroz colonizado foram misturados em 100 mL de água e adicionado 150 µL de Tween 80. Essa mistura permaneceu sob agitação por 1h a 180 rpm. Em seguida, o líquido foi filtrado em bomba a vácuo com filtro de Whatman 1. Após essa primeira filtragem, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 15.000 rpm e o sobrenadante foi novamente filtrado em malha de 0,22 µm. O extrato obtido foi armazenado durante um ano a 4°C e após esse tempo a atividade proteolítica foi quantificada no período de julho de 2016 a maio de 2017, para verificar se com o tempo a atividade da enzima era reduzida.

A quantificação de proteases foi efetuada pelo método caseinolítico (CHAKRABORTY & MALATHI, 1991). Para a reação foram utilizados 50 µL de extrato bruto, 450 µL de tampão e 500 µL de caseína 1% pH 7,0 em tubos eppendorf, que permaneceram 15 min a 45 °C em banho termostático. A reação foi interrompida pela adição de 1000 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min, e o sobrenadante foi selecionado para a determinação da absorvância em espectrofotômetro a 280 nm. A curva padrão de tirosina foi construída para a quantificação da atividade proteolítica. Uma unidade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µg de tirosina por minuto nas condições do ensaio.

Foram também avaliados o pH e temperatura de máxima atividade proteolítica. A temperatura foi avaliada na faixa de 25 a 65 °C e o pH de 5 a 10. Na faixa de pH 5 a 8, foi utilizado o tampão citrato fosfato 100 mM e para pH 9 e 10 o tampão glicina-NaOH 100 mM.

## 2.2 Isolados fúngicos

Os isolados de *P. chlamydosporia* (PC-4, PC-10, PC-14, PC-35, PC-40, PC-45, PC-46 e PC-54) utilizados nesse estudo, originados de diferentes regiões do Brasil (**Tabela 1**), pertencem à micoteca do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides e foram mantidos em placas de Petri em meio sólido de ágar batata dextrose.

Tabela 2: Local de origem de cada isolado do fungo *Pochonia chlamydosporia*

Isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	Localização (Município- Estado)
PC-4	Viçosa-Minas Gerais
PC-10	Viçosa-Minas Gerais
PC-14	Viçosa-Minas Gerais
PC-35	Cassilândia-Mato Grosso do Sul
PC-40	Cassilândia-Mato Grosso do Sul
PC-45	Mariópolis-Paraná
PC-46	Mariópolis-Paraná
PC-54	Mariópolis-Paraná

## 2.3 Produção de protease por isolados de *Pochonia chlamydosporia* em meio sólido

Para verificar a produção de protease dos oito isolados de *P. chlamydosporia*, esses foram cultivados em meio sólido constituído de 150 g arroz umedecido com 25 mL de água, previamente autoclavados por 15 min a 121°C. Para o cultivo desses isolados, os recipientes foram mantidos em BOD a 28°C por 13 dias e foi feita a homogeneização do conteúdo dos recipientes a cada dois dias. Após esse intervalo de tempo, as extrações foram realizadas com 2 mL de água por grama do arroz colonizado, mantidos sob agitação por 1 h a 4°C. Em seguida, utilizando filtros de nylon, o arroz foi separado, e os extratos obtidos foram centrifugados por 15 min a 10.000 g. Os sobrenadantes dos diferentes isolados foram utilizados para os ensaios de atividade proteolítica. O tratamento testemunha foi submetido às mesmas condições, porém sem o inóculo. Os ensaios foram preparados em duplicata.

A quantificação de proteases foi efetuada conforme o item 2.1 e as atividades dos extratos foram medidas em tampão citrato fosfato 100 mM pH 4,5, citrato fosfato 100 mM pH 6,5 e glicina-NaOH 100 mM pH 8,5.

## 2.4 Proteômica

### 2.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese unidimensional foi realizada em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 12% (p/v) com gel de empilhamento 5% (p/v) (LAEMMLI, 1970). Os extratos brutos dos diferentes isolados foram combinados com tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; SDS 1,0% (p/v); azul de bromofenol 0,0025% (p/v); glicerol 20% (v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol 5,0% (p/v)) na proporção 3:1 e fervidos por 5 min. A corrida eletroforética foi realizada por 3 h a 80 V. Para revelação das bandas proteicas, o gel foi corado com prata (MORTZ et al., 2001).

O gel para zimograma foi preparado em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 12% (p/v) com gel de empilhamento 5% (p/v) (LAEMMLI, 1970). No gel de separação, a água foi substituída por gelatina em uma concentração final de 0,1% (p/v). Os extratos brutos dos diferentes isolados foram misturados com tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; azul de bromofenol e 0,0025% (p/v); glicerol 20% (v/v)) na proporção 3:1. A corrida eletroforética foi realizada por 3 h a 80 Volts. Em seguida, o gel foi incubado em solução de triton-X 2,5% (v/v) a 4°C por 1,5 h para a remoção do SDS e posteriormente permaneceu incubado por 1 h na solução tampão citrato fosfato 100 mM pH 6,5. Para visualização dos halos de degradação da proteína, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (etanol 45 % (v/v), ácido acético 10% (v/v) e Coomassie Blue R-250 0,1% (p/v)) por 3 h, seguido do processo de descorar com solução contendo etanol 45 % (v/v) e ácido acético 10% (v/v) até a visualização nítida dos halos (HEUSSEN et al., 1980).

### 2.4.2 Tripsinização de proteínas

O gel corado com prata foi submetido à etapa de descoloração por 15 min utilizando-se solução de ferricianeto de potássio 30 mM e solução de tiosulfato de sódio 100 mM, que foram misturadas na proporção 1:1. Posteriormente, o gel foi lavado cinco vezes com água destilada para retirar resíduos da solução (CHEVALLET et al., 2006).

A banda referente ao isolado PC-40 foi excisada do SDS-PAGE, colocada em microtubo e submetida a lavagens com solução de acetonitrila 50% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM. Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados com acetonitrila por 5

min (2X) e secos a temperatura ambiente. A etapa seguinte consistiu da redução das proteínas com uma solução de DTT 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56°C em banho termostático. Após esse tempo, as proteínas foram alquiladas em solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min a temperatura ambiente na ausência de luz. Posteriormente executou-se a lavagem dos fragmentos do gel com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min (2X) e a desidratação com acetonitrila por 5 min. Os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente até evaporação total da solução.

No processo de digestão enzimática, os fragmentos do gel foram reidratados com solução contendo 20 ng/mL de tripsina (Trypsin, from porcine pancreas, Proteomics grade - Sigma) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 acrescido de acetonitrila 10% (v/v) e mantidos em banho de gelo durante 45 min para absorção da enzima pelo gel. Sucedida essa etapa, foram adicionados 100 µL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM e os microtubos foram incubados a 37°C por 16h em banho termostático. Posteriormente, os microtubos foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, centrifugados a 1500 rpm por 2 min e a solução removida para novos microtubos. Ao gel que restou no microtubo, foram adicionados 40 µL de solução composta de ácido fórmico 5% (v/v) e acetonitrila 50% (v/v) para recuperar maior quantidade de fragmentos trípticos. O material novamente foi submetido a banho ultrassom por 10 min, centrifugado e foi obtida mais uma solução de peptídeos. As soluções trípticas recuperadas foram concentradas em *speed vac* até secagem total.

### 2.4.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para a identificação de proteínas de *P. chlamydosporia* (PC-40), a amostra tripsinizada foi solubilizada em solução de ácido fórmico 0,1% (v/v). Em seguida, a análise foi efetuada via LC-MS-MS, utilizando-se o sistema UPLC (nanoAcquity-Waters), contendo uma coluna *trap* e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 µm -100 µm ×100 mm operando com uma taxa de fluxo de 0,5 µL/min. O acoplamento ao espectrômetro de massa do tipo Q-tof (Bruker) permitiu analisar os peptídeos eluídos do UPLC, atuando no modo *online* e utilizando uma fonte de ionização nanoESI. As fases móveis utilizadas para o gradiente foram: água e ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) (B). Os dados foram adquiridos através do *software Hystar* (Bruker) e os espectros foram processados com o *software Data Analysis* (Bruker) utilizando as configurações padrão para proteômica. Os espectros foram avaliados utilizando o programa PEAKS 7 para identificação de proteínas pelo método de *sequenciamento de novo*

simultaneamente com a pesquisa em banco de dados de sequências de proteínas de fungo (Fungi Uniprot). Os parâmetros utilizados na busca foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável, tolerância de erro de 0,05 Da tanto para o íon parental, quanto para os fragmentos. As proteínas foram consideradas identificadas quando apresentavam pelo menos três peptídeos únicos com False Discovery Rate (FDR) menor que 1%.

## **2.5 Solubilização de fosfato por isolados de *Pochonia chlamydosporia* em meio sólido**

Para verificar a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato, esses foram cultivados no seguinte meio: ágar-água 1,5% (p/v), glicose 10 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g/L,  $\text{NaCl}$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  170 mg/L. O pH foi ajustado para 7 e posteriormente o meio foi autoclavado por 15 min a  $121^\circ\text{C}$ . No centro de cada placa de Petri, foram adicionadas um disco de cultura 5 mm de diâmetro de cada isolado fúngico cultivado em BDA e armazenado por 21 dias a  $28^\circ\text{C}$ . As placas foram mantidas em BOD a  $28^\circ\text{C}$  por três dias e o diâmetro da colônia e do halo foram medidos com auxílio de paquímetro. O experimento foi realizado em seis replicatas para cada isolado (ZAVALA-GONZALEZ et al., 2015).

## **2.6 Solubilização de fosfato por isolados de *Pochonia chlamydosporia* em meio líquido**

Foi conduzida a fermentação líquida utilizando o seguinte meio: glicose 10 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g/L,  $\text{NaCl}$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  170 mg/L. O pH foi ajustado para 7 e posteriormente o meio foi autoclavado por 15 min a  $121^\circ\text{C}$ . A cada frasco contendo 150 mL de meio cultura, foram adicionadas três discos de cultura de 5 mm de diâmetro de cada isolado fúngico, cultivado em BDA e armazenado por 21 dias a  $28^\circ\text{C}$ . Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a  $28^\circ\text{C}$  durante 3 dias. Após esse período, o valor de pH foi medido e a quantidade de fosfato foi mensurada. O tratamento testemunha foi preparado nas mesmas condições, mas sem o inóculo fúngico. Esse ensaio foi realizado em triplicata para cada isolado.

## 2.7 Quantificação de fosfato

A reação para quantificação de fosfato foi constituída pela amostra obtida da fermentação líquida acrescida de solução contendo  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  50 g/L e  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  2,5 g/L, na proporção 1:1. Após 10 min de incubação da reação, foi feita a leitura de absorvância a 420 nm. Para a quantificação do fosfato nas amostras, foi construída uma curva padrão relacionando a absorvância a diferentes concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

## 2.8 Identificação de ácidos orgânicos produzidos por *Pochonia chlamydosporia* (PC-10)

A secreção de ácidos orgânicos pelo isolado PC-10, a partir da amostra obtida da fermentação líquida, foi avaliada utilizando-se o sistema HPLC Shimadzu série 20A equipado com coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) e detector UV. A eluição foi feita com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 mol/L com fluxo 0,6 mL/min e temperatura da coluna 60°C. Os padrões comerciais de ácidos orgânicos (ácido acético, cítrico, propiônico e butírico) foram injetados nas mesmas condições (ZEPPA et al., 2001- Modificado)

## 2.9 Cultivo dos isolados de *Pochonia chlamydosporia* em meio sólido e atividade de fosfatase

A produção de fosfatase por oito isolados de *P. chlamydosporia* foi verificada a partir do cultivo em meio sólido constituído de 150 g de arroz umedecido com 25 mL de água e autoclavados por 15 min a 121°C. Os recipientes foram mantidos em BOD a 28°C por 13 dias, com homogeneização do conteúdo de cada recipiente a cada dois dias. Após esse intervalo de tempo, as extrações foram realizadas com 2 mL de água por grama do arroz colonizado, mantidos sob agitação por 1 h a 4°C. Em seguida, o arroz foi separado do extrato utilizando filtros de nylon, e os extratos obtidos foram centrifugados por 15 min a 10.000 g. Os sobrenadantes dos diferentes isolados foram utilizados para os ensaios de atividade fosfatase. O tratamento testemunha foi submetido às mesmas condições, porém sem o inóculo fúngico. Os ensaios foram preparados em duplicata.

As atividades de fosfatases foram determinadas utilizando o substrato p-nitrofenilfosfato (pNFF) com concentração final de 2 mM, em tampão acetato de sódio/ácido

acético 100 mM pH 4,5 e glicina/NaOH 100 mM pH 8,5. As reações foram paralisadas após 20 min com carbonato de sódio 500 mM. As leituras de absorvâncias foram feitas a 405 nm e os valores foram convertidos em atividade utilizando-se uma curva padrão de p-nitrofenol. Uma unidade de fosfatase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio (NAHAS, 2015-Modificado).

## **2.10 Produção e quantificação de auxina por isolados *Pochonia chlamydosporia in vitro***

Para a avaliação da produção do ácido indol acético (AIA) os diferentes isolados foram cultivados em meio líquido constituído de 20 mL de meio de batata dextrose (BD) 24 g/L suplementado com 2 mg/mL de L-triptofano, e foram incubados por 20 dias, a 25°C e a 150 rpm. Os meios foram filtrados em papel filtro e centrifugados por 20 min a 10.000 g a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante obtido foi acrescentada a dois volumes do reagente Salkowski (50 mL de 35% (v/v)  $\text{HClO}_4$  +1mL de 0,5 M  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e incubados por 30 min no escuro. A leitura de absorvância foi realizada a 530 nm e para a construção da curva padrão foi utilizado padrão comercial de AIA diluído em diferentes concentrações no mesmo meio de cultura usado para cultivar o fungo. O tratamento testemunha foi feito sem o inóculo fúngico e submetido aos mesmos parâmetros de cultivo. Os meios foram preparados em triplicatas assim como o ensaio de análise espectrofotométrica (ZAVALA-GONZALEZ et al., 2015).

## **2.11 Teste colorimétrico para compostos fenólicos**

As amostras obtidas com a fermentação em meio BD com L-triptofano foram avaliadas quanto à presença de compostos fenólicos por meio de análises qualitativas. A reação pelo método de Folin-Ciocalteu foi composta por 50  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% (p/v) e 50  $\mu\text{L}$  de amostra (SINGLETON et al., 1999). A reação pelo método do Azul da Prússia foi constituída de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  100 mM preparado em HCl 100 mM, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  8 mM preparado em água e 150  $\mu\text{L}$  de amostra diluída 5X. Para ambos os métodos, o aparecimento da cor azul indica positivo para a presença de compostos fenólicos (PRICE & BUTLER, 1977).

## 2.12 Quantificação de fitohormônios por isolados *P. chlamydosporia* por LC/MS-MS

As amostras obtidas com a fermentação em meio BD com L-triptofano referentes aos isolados PC-10, PC-40, PC-46 e controle foram filtradas com malha de nylon 0,25 µm e 300 µL do extrato obtido foram colocados em *vials*, dos quais 5 µL foram injetados automaticamente no sistema LC/MS-MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 µm, 2,1 x 50 mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1,8 µm (Agilent). A fase móvel consistiu em: (A) ácido acético 0,02% (v/v) em água e (B) ácido acético 0,02% (v/v) em acetonitrila em gradiente de tempo/porcentagem de B de: 0/2; 11/60; 13/98; 17/98; 19/2; 20/2. Fluxo de 0,3 mL/minuto e temperatura da coluna de 23°C foram utilizados.

No espectrômetro de massas foi utilizada a fonte de ionização ESI (Electrospray Ionisation) com as seguintes condições: temperatura do gás 300 °C, taxa do fluxo de nitrogênio 10 L/min, pressão do nebulizador 35 psi e voltagem do capilar de 4000 V.

O equipamento foi operado no modo MRM (multiple reaction monitoring), o qual foi monitorado a massa do íon precursor/fragmento estabelecido mediante testes de fragmentação de cada molécula: citocinina (zeatina) (220/136), etileno via ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC) (102,1/56,2), ácido abscísico (ABA) (263/153), ácido indol acético (AIA) (176/130), ácido salicílico (AS) (137/93), giberelina 3 (GA3) (345/142.9), ácido jasmônico (JA) (209/59) e giberelina 4 (GA4) (331/21). Citocinina, AIA e ACC foram escaneados no modo positivo, enquanto ABA, AS, GA3, GA4 e JA no modo negativo. As quantificações dos hormônios foram efetuadas por meio de curvas de calibrações (0,1 ng a 400 ng) utilizando-se os respectivos padrões de cada hormônio. Os dados gerados foram analisados no software Skyline para obtenção da área do pico referente ao hormônio nas amostras e os resultados foram expressos em ng/mL. A quantificação foi realizada para amostras em triplicata.

### 2.13 Análise estatística

Para as análises estatísticas, foram calculadas as médias e desvios-padrão dos resultados. Quando indicado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com significância de 5%, utilizando o programa R.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação do extrato de *Pochonia chlamydosporia* (PC-10)

A VCP1 de *Pochonia chlamydosporia* é uma protease importante no processo de infecção de ovos de fitonematoides devido a sua ação na camada de proteção desses. Desse modo, foi avaliada a capacidade do *P. chlamydosporia* (PC-10) secretar proteases em meio sólido. Foi constatado que a protease presente no extrato ainda tinha capacidade de hidrólise de substrato proteico mesmo após um ano de armazenamento do extrato. As condições de maior atividade para a protease foram pH 6 e faixa de temperatura 45-55°C (**Figura 1**).

Esse extrato foi proveniente do cultivo do fungo em arroz sem adição de solução de minerais, umedecido com água. O arroz possui menor quantidade de proteínas, comparado com outros substratos como farelo de trigo, farelo de soja e leite em pó, que são amplamente utilizados para a produção de proteases de diversos microrganismos (RADHA, et al., 2012; MEENA et al., 2013). Além do mais, a disponibilidade de glicose é alta devido à hidrólise do amido no processo de esterilização e a presença de fontes de carbono facilmente metabolizadas como a glicose, pode resultar na repressão de vários genes de fungos necessários para metabolizar outras fontes de carbono (RONNE, 1995). Estudos relatam que os níveis da protease VCP1 e do seu mRNA de *P. chlamydosporia* são reprimidos com adição de glicose ao meio de cultura, verificados após de 24 h de cultivo (WARD et al., 2012). Mesmo em condições não favoráveis de cultivo o fungo foi capaz de secretar proteases demonstrando a eficiência desse microrganismo.

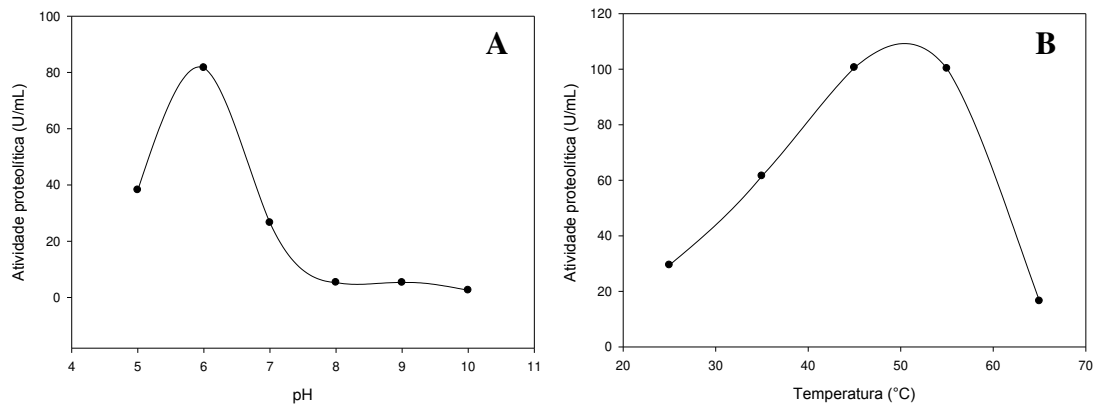


Figura 1: Caracterização enzimática quanto a pH (A) e temperatura (B) para a protease produzida pelo isolado PC10 em fermentação sólida, a partir de um extrato bruto armazenado por 1 ano a 4° C.

Visto que protease apresentou atividade, essa foi avaliada de julho de 2016 até maio de 2017 para verificar se a atividade seria reduzida. A **Figura 2** apresenta que a atividade da enzima permaneceu sem grandes alterações até agosto de 2016. No entanto, quando a atividade foi repetida em 2017 foi constatada uma pequena redução. Os dados indicam que a protease se manteve estável por mais de dois anos quando armazenada a 4°C. Esse resultado é relevante, pois geralmente as proteases não mantêm a atividade por tanto tempo, mesmo proteases que possuem características para serem aplicadas na indústria (DINI, 2010; NETO, 2012).

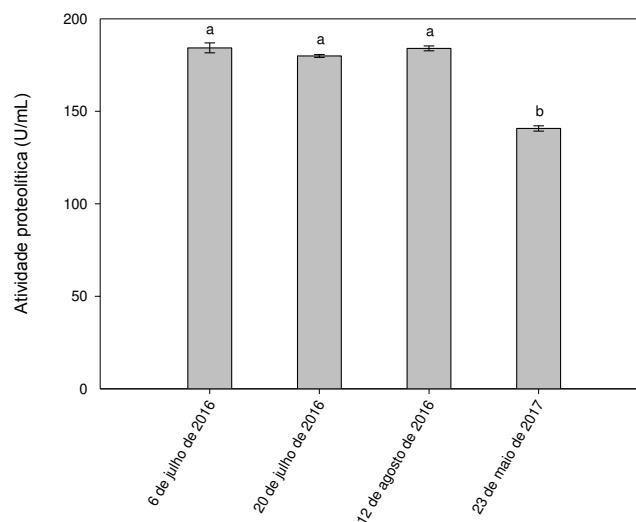


Figura 2: Atividade proteolítica do extrato do PC10 armazenado por 1 ano a 4°C. A atividade foi mensurada no período de julho de 2016 a maio de 2017. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Produção de protease por *Pochonia chlamydosporia* em meio sólido

Devido à capacidade do *Pochonia chlamydosporia* em secretar protease nas condições citadas acima foi verificada a produção dessa classe de enzima por diferentes isolados desse fungo. Todos os isolados possuem a capacidade de produzir protease no período de 13 dias, mas diferiram na atividade proteolítica (**Figura 3**). As proteases produzidas pelos diferentes isolados possuem baixa atividade em condições ácidas (pH 4,5) e moderada atividade em condições alcalina (pH 8,5). Em pH 6,5 houve a maior atividade proteolítica para todos os isolados, sendo PC-14 e PC-46 responsáveis pela maior e menor atividade, respectivamente, nesse pH.

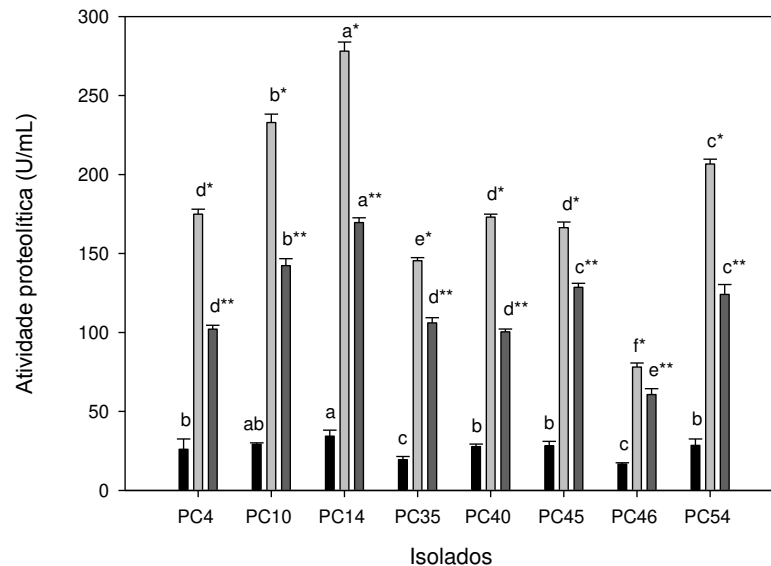


Figura 3: Atividade proteolítica de diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia* em pH 4,5 , 6,5 e 8,5.

■ pH 4,5; ■ pH 6,5 ■ pH 8,5. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As médias de atividade proteolítica dos diferentes pHs foram comparadas separadamente, \* refere-se a pH 6,5 e \*\* a pH 8,5.

Esteves et al. (2009) também analisaram a produção de protease de outros isolados de *P. chlamydosporia* e encontraram diferenças na atividade proteolítica entre os isolados após o cultivo dos fungos por cinco dias. Para compreender melhor essa diferença, os autores cultivaram os microrganismos durante três, cinco e sete dias, e foi verificado que os isolados possuem tempo de cultivo diferente para atingir a máxima produção de protease.

A avaliação da produção de protease pelos isolados durante um intervalo de tempo poderia explicar as diferenças encontradas na atividade enzimática do presente estudo, visto que os fungos podem crescer de modos diferentes, influenciando a secreção das proteases.

O organismo ou planta de onde os fungos foram isolados, bem como a sua origem, podem influenciar na síntese de moléculas e em outros processos (KERRY & BOURNE, 1996). Morton et al. (2003) analisaram isolados de *P. chlamydosporia* oriundos de nematoides de galhas e de cistos por meio de estudos genômicos e identificaram dois polimorfismos na sequência de aminoácido da VCP1. Os isolados de nematoide de galhas possuem um resíduo de glutamato e glicina na posição 171 e 208, respectivamente. Por outro lado, na enzima dos isolados de origem de nematoide de cisto existe um resíduo de glutamina (posição 171) e alanina (208).

No primeiro polimorfismo, a troca de um resíduo ácido por um neutro, de tamanhos similares, pode acarretar em mudança na densidade da carga elétrica da enzima. Conseqüentemente a interação da enzima com a casca do ovo de fitonematoides pode ser alterada, logo a protease produzida pelo fungo isolado do nematoide de cistos pode ter adsorção diferente aos ovos em relação à protease de isolados de nematoide de galhas (MORTON et al., 2003).

A posição 208 se encontra na região de ligação ao substrato, e a troca do resíduo glicina por alanina pode afetar diretamente a atividade da protease, pois a alanina tem peso molecular maior, podendo afetar a ligação do substrato. No estudo, Morton et al. (2003) compararam os perfis de utilização de diferentes substratos pela VCP1 do fungo isolado de nematoides de galhas e de cistos e foi constatado que as enzimas utilizavam os substratos de formas diferentes. O substrato mais hidrolisado pela VCP1 do isolado de nematoide de galhas foi o menos hidrolisado pela VCP1 do isolado de nematoide de cistos e vice-versa. Essa diferença de hidrólise dos substratos comerciais pode ser efeito do polimorfismo na região 208, sugerindo-se que essas enzimas possam ter eficácias diferentes na hidrólise da casca do ovo de fitonematoides (MORTON et al., 2003).

### 3.3 Proteômica

#### 3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A **Figura 4** representa o SDS-PAGE e o zimograma dos extratos obtidos dos isolados de *P. chlamydosporia*. Na **Figura 4A**, pode-se observar a presença de apenas uma banda proteica para cada isolado, que pode ser referente à protease detectada nesse estudo, mas também pode conter outras proteínas com peso molecular semelhante à protease. Os isolados PC-35 e PC-46 possuem as bandas de menores intensidades no gel, e foram os isolados com menores atividades. De acordo com o marcador utilizado, o peso molecular estimado para a enzima de interesse é por volta de 35 kDa para todos os isolados (**Figura 4A**).

O uso do substrato arroz para a produção de protease por *P. chlamydosporia* é vantajoso do ponto de vista de purificação, porque praticamente não existem proteínas do substrato no extrato e a produção de outras proteínas é muito baixa, visto que no gel foi observada apenas uma banda, que é uma imagem comum quando a proteína é submetida a várias etapas de purificação e não para extrato bruto, como o utilizado (BOUACEM et al., 2015). Uma quantidade menor de diferentes proteínas no meio é benéfica, pois permite a determinação de características de máxima atividade para pH e temperatura de forma mais precisa.

A capacidade das proteases em hidrolisar substratos proteicos, como a gelatina, foi confirmada por meio da detecção de halos de degradação para todos isolados (**Figura 4B**).

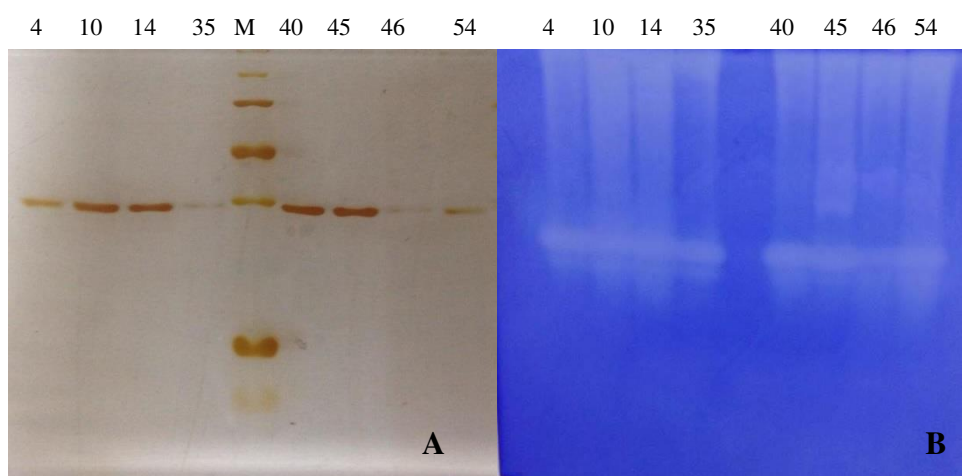


Figura 4: (A) SDS-PAGE realizado com os extratos brutos dos oito isolados de *P. chlamydosporia*. (B) Zimograma para os isolados utilizando o substrato gelatina. 4, 10, 14, 35, 40, 45, 46 e 54 correspondem à identificação referente aos isolados *P. chlamydosporia*. M corresponde ao marcador de peso molecular utilizado.

### 3.3.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

A proteômica do isolado PC-40 sugere que em uma única banda proteica do SDS-PAGE há três proteínas diferentes de massas moleculares muito próximas. Os peptídeos referentes ao isolado PC-40 apresentaram similaridade com a protease subtilisina-like de *Pochonia chlamydosporia* 170, visto que sete peptídeos detectados possuem identidade com a sequência dessa proteína (**Figura 5**).

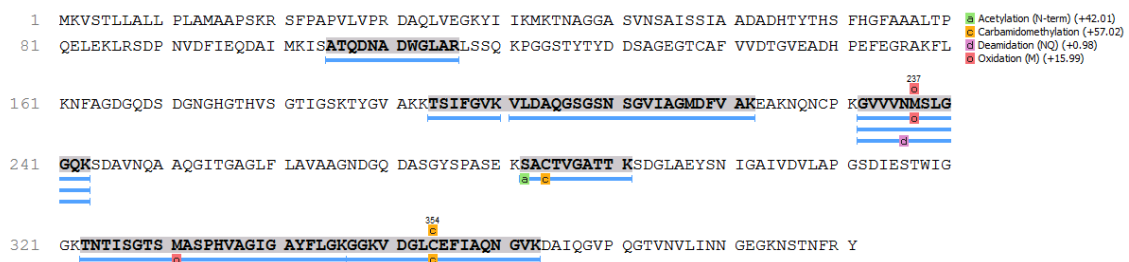


Figura 5: Sequência referente à protease subtilisina-like de *Pochonia chlamydosporia* 170 indicando os peptídeos do isolado PC-40 que apresentaram identidade com a sequência.

Sobre essa protease identificada não há relatos na literatura, apenas a sua anotação no genoma (LARRIBA et al., 2014). Porém, quando o estudo de protease envolve o organismo *Pochonia chlamydosporia*, o grande destaque é para a protease VCP1, amplamente estudada devido à sua ação no processo de infecção de ovos de fitonematoides. Deste modo, verificou-se a semelhança da protease subtilisina-like com a VCP1 em relação à sua função, sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional.

Com base nas anotações do genoma e a base de dados UniProt, a protease subtilisina-like foi inferida como sendo uma protease de atividade serino-tipo endopeptidase, a mesma função atribuída à VCP1, e ambas possuem massas moleculares muito próximas (LARRIBA et al., 2014). A sequência de aminoácidos da protease subtilisina-like possui grande similaridade com a sequência da VCP1 observado através do alinhamento das sequências (**Figura 6**) realizado utilizando o software MAFFT version 7. No entanto, ocorrem variações em resíduos de aminoácidos entre as sequências, sendo necessário verificar a influência dessas no dobramento final da proteína. Logo, por meio da plataforma Phyre 2, as estruturas tridimensionais de ambas as proteínas foram preditas e comparadas utilizando o Pymol, obtendo-se o alinhamentos das estruturas (**Figura 7**).

Baseado no estudo *in silico*, sugere-se que as diferenças de aminoácidos não devem afetar o dobramento final da proteína, visto que a estrutura de uma proteína praticamente

sobrepôs a estrutura da outra, indicando alta similaridade entre elas. Apenas uma pequena porção de  $\alpha$  hélice e regiões curtas de não dobramento foram verificadas a mais na estrutura da protease subtilisina-like (cor rosa na Figura 7) em relação a VCP1 (cor azul). Possivelmente a protease subtilisina-like possui ação no processo de infecção dos ovos de fitonematoides, assim como a VCP1 devido à semelhança no dobramento final da proteína.

```

h1B4Y0M5B4Y0M5_METCM/1-372      1  I P A I V E Q R A E P A F L F T F K . S S V I A G K V I V F R D G V A R F A A D E T E A L S S K A D H V V S H L F N F A G S L T K E E L K T L R N H F O V D F I E K D A V M T A N I V E E G G R P N G U O R I S H R Q K S T T Y R 118
h1A0A179FP2jA0A179FP2_METCM/1-376 1  A P S . . . . K R S F P A R V L V R D R A Q L V E K Y I I K M T N A G G A S V N S A I B S T A A D A D H T V T H S E H G F A A L T P O E L K L R S D R N V D F I E Q D A I M K I S A . . . T Q D N A D W G L A R L S S Q K P G S T Y T W 114

h1B4Y0M5B4Y0M5_METCM/1-372      119 D D S A G N G A C V Y V L D T G I E T S H P E F E G R A T W L K S F I . D G E D N D G H S H G T H C A G T I G S K T Y G V A K K A K I F A V K V L D N G S G T Y A G V I A G M E F V S Q D Y K T G O D P N G A I A S M S L G G P F S A T V N 236
h1A0A179FP2jA0A179FP2_METCM/1-376 115 D D S A G E T G A F V V D T G V E A D H P E F E G R A K F L N R A G D G D S D G N G H G T H V S G T I G S K T Y G V A K K T S I F G V K V L D A G S S G S N S B V I A G M O F M A K E A K N D N R K G V V V N M S L G G K S D A V N 233

h1B4Y0M5B4Y0M5_METCM/1-372      237 K A A A M V S S V F L A V A A G N D G A D A R F S P A S E V T R C T V G A T T S A T R S S F S N F K V V D I F A P G S A I L S T W I N G T R S I S G T S M A T P H V A G L A A Y L N A L O G V D P A A L C K K I Q D T A T K N V 355
h1A0A179FP2jA0A179FP2_METCM/1-376 234 Q A A G I T G A G L F L A V A A G N D G D A S G Y S P A S E K S A C T V G A T T K S D G L A E Y S N I G A I V D V L A P G S D I E S T W I G G K T N T I S G T S M A S P H V A G I G A Y F L G K G K V D . . G L E F I A O N G V K D A 350

h1B4Y0M5B4Y0M5_METCM/1-372      356 L T G V P A S T V N F L A Y N S . . . . . V 372
h1A0A179FP2jA0A179FP2_METCM/1-376 351 I G R V R G G T V N V I I N N G E G K N S T N F R Y 376

```

Figura 6: Alinhamento gerado pelo software Mafft no qual sequência superior é referente à protease VCP1, e a inferior à protease subtilisina-like, ambas obtidas da base de dados Uniprot. A cor azul escuro indica a ocorrência de aminoácidos idênticos nas duas sequências e azul claro para aminoácidos que diferem nas sequências.

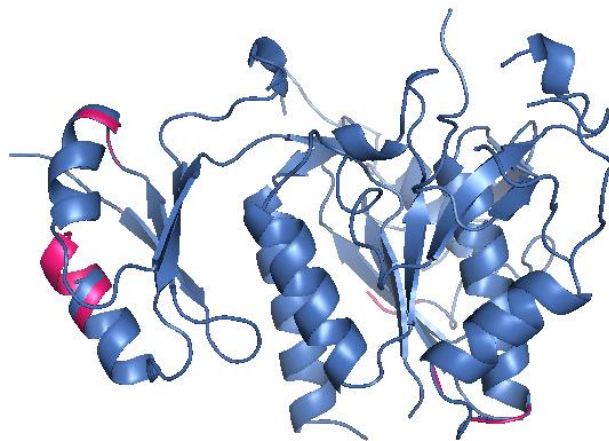


Figura 7: Alinhamento entre as estruturas tridimensionais da protease VCP1 (azul) e protease subtilisina-like (rosa) gerado por Pymol, demonstrando a alta similaridade entre as proteínas.

A amostra referente ao isolado PC-40 possui também cinco peptídeos similares a regiões da proteína carboxipeptidase de *P. chlamydosporia* 170 (**Figura 8**). Essa proteína hidrolisa ligação peptídica C-terminal nas cadeias polipeptídicas, e foi predita como metaloprotease pertencente à família M14 e possui o  $Zn^{2+}$  como cofator, segundo a base de dados UniProt. Há possibilidades de proteínas pertencentes a essa família serem expressas durante o comportamento endofítico do *P. chlamydosporia*, devido à relação dessas proteínas com a degradação de tecido vegetal (LARRIBA et al., 2014; KRIJGER et al., 2014;

MONTEIRO et al., 2017 ). Porém, ainda não existem estudos sobre metalo carboxipeptidase de *P. chlamydosporia*. Por outro lado, carboxipeptidase da classe serino, secretada por esse microrganismo, é alvo de pesquisas, como a SCP1 (ESCUADERO et al., 2016).

```

1 MKALVVLSTL VACGSTRAVE SKVSYDGYKV FRVPVDDGS HIQSVMDTLK VISWQPTRK GAFADIQVAP SQLEAFNKAM Formylation (+27.99)
81 QGHEVITMHE NLGNSIAEEG TFHAYAAGSA NDTWFKSYHG YNDHLQWLND LGNKYSKNAK VVTSGNTLQG NPITGLHIFG
161 SSGGGKPAV VFHGTVHARE WIASMVVEYM TNELITKYGS DNDITAFVVK YDFYMFPIVN VDGFKYTQSG DRMWRKNRQT
241 TSGSSCLGHD INRNWPYQWN GPGSSTNPCA EDFRGSSQGD APETKALSGF LQNVKNSQGL KLYIDYHSYS QLFMTPYGYS
321 CNARAPNDDE LQSLAKGAVD AIYSVHSVVF DYGPICCTIY QASGSSVDYV ADVVKGDYTF TSELRDTGRY GFVLPPDQIL
401 PSGEEAFAGV KYLLQNMN

```

Figura 8: Sequência referente à carboxipeptidase de *Pochonia chlamydosporia* 170 indicando os peptídeos referentes ao isolado PC-40 que apresentaram identidade com a sequência.

Peptídeos da amostra do isolado PC-40 apresentaram semelhanças com a glucana  $\beta$ -1,3 glicosidase de *Pochonia chlamydosporia* 170 (Figura 9), com sete peptídeos de identidade. Essa enzima hidrolisa ligações glicosídicas de oligossacarídeos formados por ligação  $\beta$  1-3 como a  $\beta$  glucana, composto que constitui a parede celular de fungos. Deste modo, essa enzima pode desempenhar papéis nos processos morfo genéticos-morfolíticos durante o desenvolvimento e a diferenciação (ADAMS, 2004), bem como na mobilização de  $\beta$  glucanos em resposta às condições de esgotamento da fonte de carbono e energia (PITSON et al., 1993). Para fungos que possuem ação sobre outros fungos, essa enzima pode ser um mecanismo utilizado para degradar a parede celular do hospedeiro (MARTIN et al., 2007).

O processo de renovação da parede celular é mantido pelo equilíbrio entre a hidrólise e a síntese dessa, a qual provavelmente envolve  $\beta$ -glucanases, que permitem a hidrólise da parede, e em seguida ocorre a inserção de novas moléculas de  $\beta$  glucana sem afetar a integridade geral (ADAMS, 2004). A presença de glucana  $\beta$ -1,3 glicosidase no extrato do isolado PC-40 de *P. chlamydosporia* pode ser resultado do processo de renovação da parede celular, pois dificilmente o fungo estaria em condições de inanição de carbono para estimular a degradação da parede, pois o meio de cultivo (arroz) era rico em fonte de carbono.

```

1 MHISSTILAS ALAMGVSAEN YLGFNSGATL ADRSAKFKKD FVAEMKTAQG LVGAPGTFNA IRLYTNIQAY SKDKPIEAFE Glycosylation/methylation (+57.02)
81 AAIETKTKVL LGMWTSQTDI IQNEIDV LGA AVKQYGTKFT DLVIGISIGS EDLYRDSVTG VKNKAGVGNS PDNIVKFIGD
161 YKKA FKDTPL AKVPIGHVDT WDAWNTSSVK SVIDAVDWVG VDEYPPYESG KGNKIDNAGT LFDRAY GATI GAVGGKPVVV
241 TETGWPVTGK TWDEAVPSIE NAKTYWDEVG CRQLENKVPT FWYTLRDSNP DNDVKFAITK DLSTKPLFDL TCPKTFKTKP
321 QTSSGSSSPT ATGTGASKPT GSGGSGTNGG SGGSNNTNGDS GSSTTTPAGA TTTAPKNGAS SVHKVSGAAY FALAVALAGAA
401 TLL

```

Figura 9: Sequência referente à glucana 1,3- $\beta$ -glicosidase de *Pochonia chlamydosporia* 170 indicando os peptídeos referentes ao isolado PC-40 que apresentaram identidade com a sequência.

### 3.4 Solubilização de fosfato por isolados de *Pochonia chlamydosporia* em meio sólido

Todos os isolados apresentaram capacidade de solubilizar fosfato tricálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) devido à formação do halo em meio sólido (**Figura 10**). Essa fonte de fosfato utilizada no meio de cultura sólido pode ser formada principalmente em solos alcalinos. Após adição de fertilizantes fosfatados, parte do fósforo pode interagir com o cálcio, tornando-se indisponível para as plantas (SATYAPRAKASH et al., 2017). Logo, os isolados de *P. chlamydosporia* quando colonizam a rizosfera podem ter ação sob o fosfato tricálcio presente no solo, aumentando o fosfato em solução e consequentemente proporcionando melhorias para a planta.

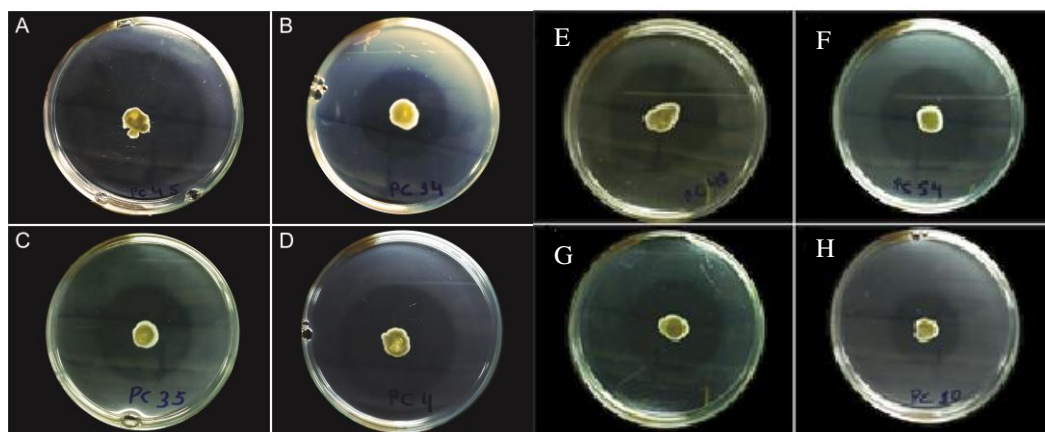


Figura 10: Formação do halo de solubilização de fosfato após três dias de cultivo de *Pochonia chlamydosporia*. (A) Isolado PC-45; (B) Isolado PC-14; (C) Isolado PC-35; (D) Isolado PC-4; (E) Isolado PC-40; (F) Isolado PC-54; (G) Isolado PC-46 e (H) Isolado PC-10.

A capacidade de outros isolados de *P. chlamydosporia* solubilizar fosfato e o índice de solubilização foram relatados por Zavala-Gonzalez et al. (2015). Nesse estudo, a fórmula escolhida pelos autores para o cálculo do índice de solubilização é baseada na formação de halos por enzimas, porém estudos indicam que a solubilização de fosfato em meio sólido não ocorre por ação de enzimas, pois a fonte de fosfato utilizada no meio é inorgânica (DEMISSIE et al., 2013; MARRA et al., 2015; LI et al., 2016). Portanto, no presente trabalho o índice de solubilização foi calculado utilizando a fórmula proposta por Premono et al., (1996).

De todos os isolados estudados, apenas os isolados PC-45 e PC-10 diferiram estatisticamente entre si com relação ao índice de solubilização calculado (**Tabela 2**).

Tabela 2: Índice de solubilização de fosfatos dos isolados de *Pochonia chlamydosporia*

Isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	*Índice de Solubilização de Fosfato
PC-45	4,59 ± 0,76 <sup>a</sup>
PC-14	4,34 ± 0,29 <sup>ab</sup>
PC-35	4,27 ± 0,37 <sup>ab</sup>
PC-4	4,12 ± 0,55 <sup>ab</sup>
PC-40	3,92 ± 0,26 <sup>ab</sup>
PC-54	3,86 ± 0,56 <sup>ab</sup>
PC-46	3,72 ± 0,49 <sup>ab</sup>
PC-10	3,54 ± 0,31 <sup>b</sup>

\*Índice de solubilização de fosfato é determinado por  $(C+H)/C$ . C corresponde ao diâmetro da colônia e H ao diâmetro do halo formado. Números seguidos de letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para analisar a capacidade de solubilização de cada isolado, nesse meio de cultivo, são necessárias mais informações além do índice de solubilização. Ademais, estudos demonstram que organismos que não formaram halos em meio sólido foram capazes de solubilizar o fosfato em meio líquido (SOUSA, 2010).

Monteiro (2013), a partir de experimentos em casa de vegetação, verificou a promoção de crescimento de tomateiros tratados com *P. chlamydosporia* (PC-10) e avaliou a quantidade de fósforo presente nas folhas. A aplicação do fungo aumentou o conteúdo de P em 24,5%, comparado com a testemunha em que *P. chlamydosporia* estava ausente. Esse resultado pode ser relacionado com a capacidade do fungo de solubilizar fosfato que foi identificada no ensaio acima, sugerindo-se que, em condições *in vivo*, o fungo tem a capacidade de solubilizar fosfato presente no solo.

### 3.5 Solubilização de fosfato por isolados de *Pochonia chlamydosporia* em meio líquido

A solubilização de fosfato em meio líquido foi verificada através da acidificação do meio e da quantificação de fosfato, pois um dos mecanismos adotados por microrganismos é a liberação de ácidos orgânicos que resultam na diminuição do pH do meio e, conseqüentemente, na liberação de P do complexo (NAIK et al., 2013). Na **Tabela 3**, apresentam-se os dados referentes às medidas de pH e à concentração de fosfato presentes nas amostras dos oito isolados e no tratamento testemunha.

Tabela 3: pH do meio e concentração de fosfato solubilizado pelos isolados de *Pochonia chlamydosporia* com três dias de cultivo em meio líquido. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	pH do extrato	Concentração de fosfato solubilizado (mg/L)	*I-C (mg/L)
PC-40	2,8 ± 0,08 <sup>c</sup>	87,0 ± 2,5 <sup>c</sup>	37,6
PC-35	3,1 ± 0,12 <sup>bc</sup>	101,5 ± 7,4 <sup>a</sup>	51,6
PC-46	3,1 ± 0,31 <sup>bc</sup>	86,0 ± 8,0 <sup>c</sup>	36,6
PC-54	3,1 ± 0,11 <sup>bc</sup>	95,0 ± 5,0 <sup>abc</sup>	45,6
PC-45	3,3 ± 0,07 <sup>bc</sup>	95,0 ± 3,4 <sup>abc</sup>	45,6
PC-10	3,4 ± 0,13 <sup>b</sup>	96,6 ± 2,7 <sup>ab</sup>	47,2
PC-14	3,4 ± 0,12 <sup>b</sup>	90,8 ± 3,9 <sup>bc</sup>	41,4
PC-4	3,5 ± 0,26 <sup>b</sup>	75,9 ± 6,0 <sup>d</sup>	26,5
Controle	6,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	49,4 ± 9,0 <sup>e</sup>	0

\*I-C refere à concentração de fosfato solubilizado do isolado menos a concentração do fosfato do meio controle

A análise dos valores de pHs dos extratos, obtidos após três dias de fermentação, apresentou que somente o isolado PC-40 diferiu estatisticamente dos isolados PC-10, PC-14 e PC-4, mas em relação ao controle houve diferença significativa para todos os isolados. Os isolados de *P. chlamydosporia* proporcionaram a diminuição do pH indicando que esses possuem mecanismos que acarretam a acidificação do meio contribuindo para a liberação do fosfato. Desse modo, esse foi quantificado e houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os isolados, principalmente entre o PC-35 e o PC-4, a máxima e a mínima concentração de fosfato detectado, respectivamente (**Tabela 3**). Entre esses parâmetros analisados não existe uma relação direta entre pH e concentração de fosfato solubilizado, uma vez que o isolado PC-40 diminuiu mais o pH e não foi o que mais liberou fosfato. Essa falta de relação entre os dois parâmetros também foi verificada em outros estudos que utilizaram microrganismos solubilizadores (NARSIAN & PATEL, 2000; OLIVEIRA et al., 2009). Desse modo, apenas a medida de pH não é um bom parâmetro para verificar a eficiência de cada isolado em solubilizar fosfato.

Verificar a solubilização de fosfato em diferentes meios (líquido/sólido) é de extrema importância quando se avalia isolados do mesmo microrganismo. Nessa análise, o meio líquido forneceu um número maior de dados e observou-se que o isolado PC-10, que apresentou o menor índice de solubilização, no meio líquido foi o segundo que mais disponibilizou o fosfato do complexo, logo a obtenção de dados quantitativos são mais significativos para avaliar a capacidade de cada isolado *in vitro*.

A disponibilização de fosfato pode ocorrer por mecanismos envolvendo a produção de ácidos orgânicos ou pela ação de fosfatases, os quais estão relacionados com a fonte de fosfato que será utilizada (OTEINO et al., 2015). Os extratos obtidos da fermentação líquida foram avaliados quanto à presença de fosfatases ácida e alcalina por meio de atividade enzimática, porém não foram detectadas atividades dessas enzimas para nenhum isolado (dados não apresentados). Previa-se que a solubilização de fosfato não ocorresse por ação dessas enzimas visto que sua ocorrência é relatada quando se utiliza fosfato orgânico, e nesse experimento foi utilizada uma fonte inorgânica,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

### 3.6 Identificação de ácidos orgânicos produzidos por *Pochonia chlamydosporia* (PC-10)

A disponibilização de P por microrganismos pode ocorrer por meio de acidificação do solo devido à secreção de ácidos orgânicos. Analisando o extrato do isolado PC-10 por HPLC, detectou-se a presença de ácido acético, cítrico e propiônico. Dessa forma, o PC-10 possui a capacidade de solubilizar fosfato por meio da liberação de ácidos orgânicos com três dias de fermentação. O tratamento testemunha também foi analisado e não houve detecção de nenhum ácido orgânico.

A acidificação do meio ocorre devido a liberação de prótons dos grupos carboxilas dos ácidos orgânicos e conseqüentemente os ânions dos ácidos orgânicos formam complexos estáveis com os cátions que se ligam ao P e assim desestabilizam o mineral, tornando o P disponível no meio. Os ácidos orgânicos possuem capacidades de complexação diferentes, uma vez que o número e a posição de grupos carboxílicos, pH do meio, concentração e o tipo de metal influenciam diretamente nesse processo (JONES, 1998). Kpombrekou & Tabatabai (1994) analisaram como a composição química do ácido cítrico, que possui três grupos carboxílicos e um grupo  $\beta$ -hidroxil, favoreceu a solubilização do fosfato de rocha (**Figura 11 A**). Com essa composição, o ácido pode suportar maior carga negativa, contribuindo para o processo de complexação com os íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo a liberação do grupo fosfato para o meio. Esse é um possível mecanismo que pode ter contribuído para disponibilizar o fosfato no meio a partir do ácido cítrico liberado pelo isolado PC-10 do fungo *P. chlamydosporia*.

O ácido acético e propiônico possuem apenas um grupo carboxílico (**Figura 11 B e C**) e não possuem grupo hidroxil em suas estruturas, dessa forma contribuem mais para solubilização através da acidificação do meio devido à liberação de  $\text{H}^+$ , do que pela complexação com cátions (JONES, 1998).

A identificação dos ácidos orgânicos produzidos pelo fungo *P. chlamydosporia* está relacionada com a capacidade de solubilização de fosfato pelos isolados e assim a formação do halo no meio sólido (**Figura 10**) provavelmente é devido à secreção dos ácidos que permitiu disponibilizar o fosfato.

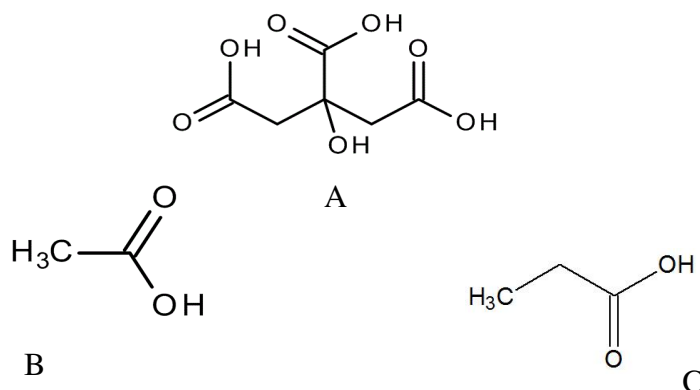


Figura 11: Estrutura química dos ácidos orgânicos. (A) ácido cítrico; (B) ácido acético; (C) ácido propiônico.

### 3.7 Cultivo dos isolados *Pochonia chlamydosporia* em meio sólido e atividade de fosfatase

No solo, o fitato é a principal fonte de fosfato orgânico, que para ser liberado é necessário à ação de fosfatases (WANG et al., 2017). A capacidade dos isolados em secretarem essas enzimas foi verificada por meio da atividade de fosfatase ácida e alcalina no extrato obtido da fermentação em meio sólido e foi constatada uma heterogeneidade de produção dessas enzimas entre os isolados. Os isolados PC-4, PC-35 e PC-40 praticamente não secretaram fosfatase alcalina, todavia para a fosfatase ácida houve maior produção por esses isolados (**Figura 12**). Referente aos isolados PC-10, PC-14, PC-45, PC-46 e PC-54 houve a produção de fosfatases ácida e alcalina. Com destaque para o isolado PC-10, que apresentou a maior atividade enzimática para a fosfatase alcalina (**Figura 12**).

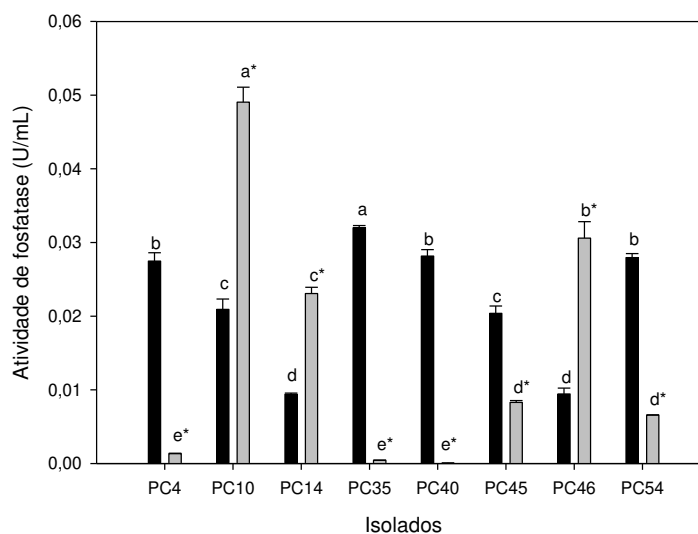


Figura 12: Atividade de fosfatase para diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia* após fermentação em meio sólido. ■ fosfatase ácida; ■ fosfatase alcalina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As médias de fosfatase ácida e alcalina foram comparadas separadamente, letra seguida de \* refere-se à fosfatase alcalina

O teste de atividade enzimática utilizado detecta fosfatases de modo geral, mas dentre essas existe a possibilidade de alguma fosfatase ter atividade de fitase também. O substrato arroz utilizado para cultivo do fungo, contém ácido fítico, e poderia estimular a produção dessa enzima (GUPTA et al., 2013). Além do mais, no genoma do fungo *P. chlamydosporia* (PC170) existe uma anotação para fitase extracelular (XP\_018141032.1) que foi inferida a partir de homologia com proteínas da família de fosfatases alcalinas (LARRIBA et al., 2014). Portanto, os isolados PC-10, PC-14, PC-45, PC-46 e PC-54 possuem maior possibilidade de terem atividade de fitase devido à atividade de fosfatase alcalina detectada. A secreção dessa enzima por *P. chlamydosporia* na rizosfera pode fazer com que seja disponibilizado o fósforo de fontes orgânicas para as plantas.

### 3.8 Produção de auxina por isolados *Pochonia chlamydosporia* *in vitro* e quantificação por teste espectrofotométrico

Após 21 dias de cultivo dos isolados de *P. chlamydosporia*, o ácido indol acético foi quantificado nos extratos utilizando o reagente Salkowski, do mesmo modo executado por Zavala-Gonzalez et al.(2015). A coloração rosa da reação após a adição do reagente Salkowski é indicativo de positivo para presença de auxina, no entanto as amostras dos

extratos fúngicos ficaram marrons (**Figura 13**). As leituras de absorvâncias das amostras foram realizadas a 530 nm, e o isolado PC-46 teve a maior absorvância, enquanto que para o isolado PC-40 a absorvância foi semelhante ao tratamento testemunha. Na ausência de interferentes, pode se relacionar diretamente o valor de absorvância à quantidade do composto de interesse, contudo quantificar o hormônio com essas absorvâncias seria um equívoco, pois como a cor ficou muito diferente do padrão, poderia superestimar ou subestimar a quantidade de hormônio produzido pelos isolados.

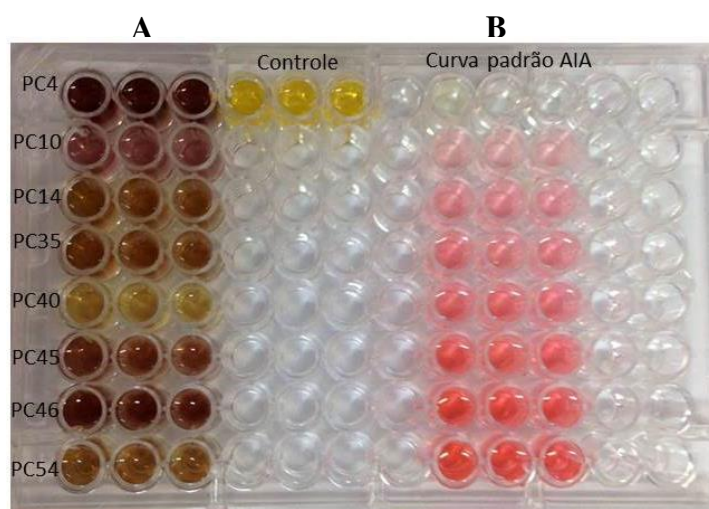


Figura 13: Teste colorimétrico para quantificação de auxina utilizando o reagente Salkowski. (A) Amostra dos isolados em triplicata. (B) Curva padrão utilizando padrão de AIA em triplicata, em diferentes concentrações.

Glickmann & Dessaux (1995) investigaram a especificidade e a sensibilidade de várias formulações do reagente Salkowski para intermediários da via do ácido indol acético e análogos ao hormônio. Ao realizar a reação do reagente Salkowski com 5-hidroxil-AIA a coloração observada foi marrom. Meudt & Gain (1967), relataram que o composto indol-3-acetaldeído na presença do reagente Salkowsk resulta também em coloração marrom. Esses estudos apresentam possíveis moléculas que poderiam ser responsáveis pela a coloração marrom observada nas amostras dos isolados. No entanto, para que essas moléculas estejam presentes, seria necessário que o fungo tivesse a capacidade de secretá-las visto que apenas o extrato obtido da fermentação foi analisado.

### 3.9 Teste colorimétrico para compostos fenólicos

A coloração marrom obtida no teste de auxina pode ser também devido à presença de interferentes. As amostras foram submetidas a dois métodos colorimétricos para compostos

fenólicos totais, Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu, e ambos apresentaram coloração azul indicando a presença de compostos fenólicos.

Para o teste de Folin-Ciocalteu, o controle (C), que continha apenas o meio de cultura sem inóculo, também ficou azul, mas com uma intensidade menor em relação às amostras referentes aos isolados PC-4, PC-10, PC-14, PC-35 e PC-45 (**Figura 14 A**). No restante dos isolados, a cor ficou bem próxima à do controle, no entanto, o triptofano é um interferente desse teste, o que pode explicar a coloração azul do controle (EVERETTE et al., 2010). Pressupondo que o fungo metabolizou parte desse aminoácido, nas amostras dos isolados provavelmente exista uma quantidade menor desse, diminuindo o efeito do interferente.

No método Azul da Prússia utiliza-se o mesmo reagente do Salkowski (cloreto férrico) e as colorações das amostras ficaram muito escuras, sendo necessário diluí-las 5X. A **Figura 14 B** mostra a coloração obtida para as amostras diluídas dos isolados e todas apresentaram tonalidade azul, principalmente o controle. Provavelmente esse efeito do controle é devido ao triptofano, que está sendo oxidado e permitindo a formação do complexo azul ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) (GRAHAM, 1992). A partir dessa análise e do teste de Folin-Ciocalteu, a presença de compostos fenólicos nas amostras dos isolados pode estar interferindo no teste na auxina contribuindo para a formação da coloração marrom.

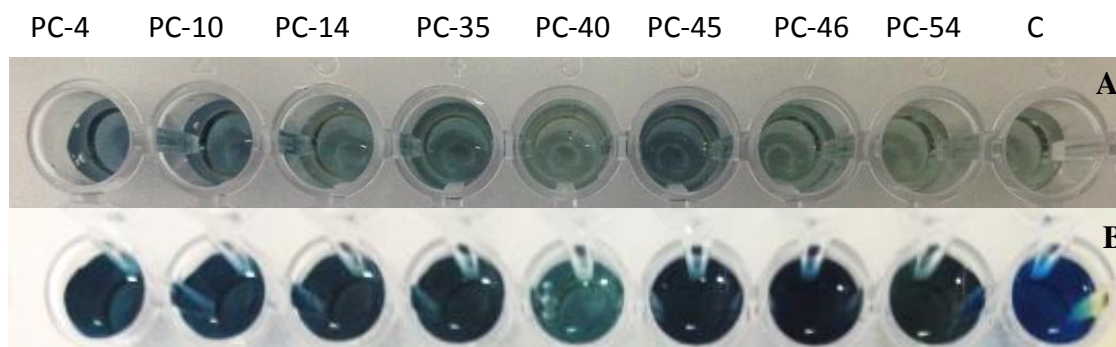


Figura 14: Teste colorimétrico para compostos fenólicos totais dos diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia*. (A) Folin-Ciocalteu; (B) Azul da Prússia. A cor azul é indicativo da presença de compostos fenólicos.

Para verificar a interferência de compostos fenólicos no reagente Salkowski, foi conduzido um ensaio utilizando padrões de ácido gálico e tânico na presença desse reagente. As reações foram preparadas nas mesmas proporções do teste de auxina (1 amostra : 2 reagente Salkowski). A **Figura 15** mostra que o ácido gálico interferiu no teste devido à coloração amarela obtida e a intensidade da cor aumentou na reação com maior concentração

do composto. Por outro lado, para o ácido tânico não houve mudança de coloração, indicando que nem todo composto fenólico interfere na reação. Após essa análise, confirmou-se que determinados compostos fenólicos podem interferir no teste da auxina quando se utiliza o reagente Salkowski. Como no extrato podem existir diferentes moléculas que respondem ao reagente de Salkowski ocasionando diferentes cores, a mistura dessas pode ser o determinante na coloração marrom visualizada.

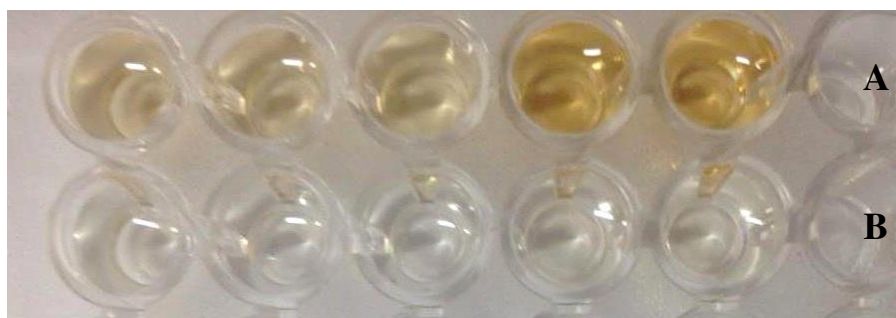


Figura 15: Teste colorimétrico utilizando o reagente Salkowski para ácido gálico (A) e para ácido tânico (B) em diferentes concentrações. Os três primeiros poços são em menor concentração do composto e os dois últimos em concentração maior.

### 3.10 Quantificação de fitohormônios produzidos por isolados *Pochonia chlamydosporia* por LC/MS-MS

Para essa análise, foram selecionados os extratos do controle e dos isolados PC-10, PC-40 e PC-46. Os extratos foram avaliados quanto à presença de diferentes fitohormônios, no entanto somente a auxina foi detectada (**Figura 16**). No controle foi detectado esse hormônio e pode ser explicado pelo fato do meio de cultivo do fungo ser constituído de batata, na qual a presença de auxina pode ocorrer principalmente se houver presença de brotos (SORCE et al., 2009; SUKHOVA et al., 1993). No entanto, essa constatação não influenciou nos dados referentes aos isolados, pois o isolado PC-10 teve concentração de auxina 4,4 vezes maior que o controle, e o isolado PC-46 concentração 3,6 vezes maior que o controle, certificando-se que os isolados possuem a capacidade de biossíntese de auxina. Essa análise comprovou que o teste colorimétrico não é adequado para a quantificação de AIA nesse caso, visto que o isolado que apresentou a maior absorvância (PC-46) não teve a maior concentração de auxina detectada por LC/MS-MS. Por outro lado, a análise do isolado PC-40 foi compatível com o teste colorimétrico, pois ambos detectaram que o isolado não foi capaz de sintetizar auxina. Além disso, é possível sugerir que esse microrganismo metabolizou a

auxina que estava presente no meio, visto que a concentração do hormônio encontrada foi menor que a existente no controle.

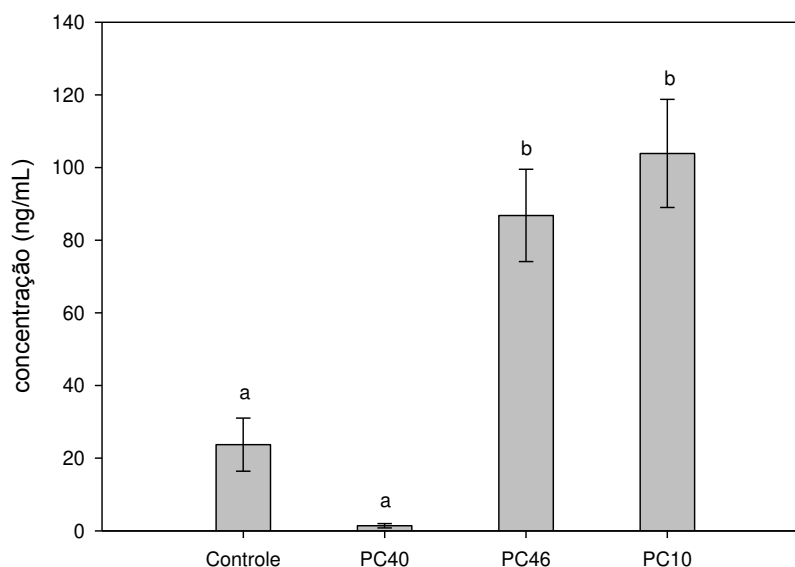


Figura 16: Quantificação de auxina (ng/mL) por LC/MS-MS em isolados de *Pochonia chlamydosporia* em meio líquido. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

*Arabidopsis thaliana* é um organismo modelo para o estudo de diferentes vias metabólicas de plantas e essa é amplamente utilizada para elucidar vias como da produção de auxina. Diferentes vias já foram identificadas para a produção desse hormônio em plantas (**Figura 17A**), mas existem etapas cujas proteínas envolvidas ainda não foram caracterizadas (NORMANLY, 2010; PIECK et al., 2015). Para microrganismos fúngicos, existem poucos estudos em relação à via metabólica de síntese desse hormônio. Entretanto a partir de dados do genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa*, Mondego et al. (2008) verificaram a existência de genes similares a genes de plantas responsáveis pela biossíntese de auxina, que os permitiram fazer anotações no genoma do fungo sobre proteínas envolvidas nessa biossíntese e assim propor uma via de biossíntese para o fungo.

Comparando algumas proteínas da via de síntese de auxina em plantas com proteínas anotadas no genoma de *P. chlamydosporia*, foi possível excluir determinadas vias devido à falta de algumas enzimas, como a aldeído oxidase, e sugerir algumas vias utilizadas pelo fungo a partir de triptofano (**Figura 17 B**).

Algumas proteínas envolvidas na biossíntese de auxina são nomeadas como YUCCA, que correspondem a uma família de flavinas monoxigenases responsáveis pela conversão de

triptamina em N-hidroxi triptamina. No genoma do fungo existem sete proteínas (XP\_018138909.1; XP\_018144619.1;XP\_018144652.1; XP\_018140616.1; XP\_018141241.1; XP\_018139078.1; XP\_018137286.1) dessa família, indicando a possibilidade do fungo realizar essas reações. Outra proteína presente na via de síntese de auxina de plantas é a nitrilase, que possui a função de converter indol-3-acetonitrila para ácido indol-3-acético, e essa enzima também está presente no genoma do fungo (XP\_018146193.1; XP\_018147229.1). Logo, é possível que o fungo siga a rota metabólica, triptofano/ triptamina/ N-hidroxi triptamina/ indol-3-acetaldoxima/ indol-3-acetonitrila / ácido indol-3-acético (**Figura 17 -1B**) a partir das proteínas que já foram identificadas na via de plantas (NORMANLY, 2010; LARRIBA et al.,2014).

Pieck et al. (2015) apresentaram outra rota para a síntese de auxina a partir do triptofano que envolve a enzima triptofano aminotransferase a qual converte triptofano em ácido indol-3-pirúvico. Porém, no genoma do *P. chlamydosporia* existe apenas a anotação para aminotransferase de aromáticos (XP\_018141569.1) que pode utilizar o triptofano como substrato. Possivelmente essa enzima exerce a mesma função da triptofano aminotransferase. (LARRIBA et al.,2014). O estudo relata também a possibilidade da conversão do ácido indol-3-pirúvico em ácido 3-indol-acético por ação da YUCCA (PIECK et al., 2015). Logo, sugere-se que o microrganismo poderia sintetizar auxina também pela via: triptofano/ ácido indol-3-pirúvico/ ácido indol-3-acético (**Figura 17-2B**).



#### 4. CONCLUSÕES

Todos os isolados de *P. chlamydosporia* foram capazes de secretar proteases, mas diferiram na quantidade de enzima secretada. O isolado PC-4 obteve a maior atividade proteolítica em pH 6,5. A capacidade de solubilização de fosfato da fonte  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  foi verificada para todos os isolados, sendo o PC-35 destaque na liberação de fosfato em meio líquido. Esse isolado também apresentou a maior atividade de fosfatase ácida. Enquanto o PC-10 foi o isolado com a maior atividade de fosfatase alcalina. A capacidade de secreção de ácidos orgânicos e fosfatases pelo fungo contribuem para maior disponibilização de fosfato para as plantas de diferentes fontes. A secreção de auxina foi confirmada nos isolados PC-46 e PC-10 pela quantificação realizada por LC/MS-MS. Essas características indicam o potencial desse fungo para aplicação biotecnológica além do controle biológico, mas também como um promotor do crescimento das plantas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, v. 150, p. 2029-2035, 2004.

BONTEMPO, A. F.; FERNANDES, R. H.; LOPES, J.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. *Australasian Plant Pathology*, v. 43, p. 421-424, 2014.

BOUACEM, K.; BOUANANE-DARENFED, A.; LARIBI-HABCHI, H.; ELHOUL, M. Ben; HMIDA-SAYARI, A.; HACENE, H.; OLLIVIER, B.; FARDEAU, M. L.; JAOUADI, B.; BEJAR, S. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 299-307, 2015.

CHAKRABORTY, R. & MALATHI, S. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 712-716, 1991.

CHEVALLET, M.; SYLVIE, L.; THIERRY, R. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Nature Protocols*, p.1852-1858, 2006.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, v. 42, p. 102-107, 2012.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G. de; LOPES, E. A.; SILVA, M. D. C. S. da; KASUYA, M. C. M.; FERRAZ, S. *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 37, p. 417-423, 2015.

DEMISSIE, S.; MULETA, D.; BERECHA, G. Effect of phosphate solubilizing bacteria on seed germination and seedling growth of faba bean (*Vicia faba* L). *International Journal of Agricultural Research*, v. 8, p. 123-136, 2013.

DINI, C.M. Produção, Purificação e Caracterização da Protease de *Thermomucor Indicae Seudaticae* N31 e Avaliação de sua Aplicação na Fabricação de Queijo Maturado (Tese). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, p. 69, 2010.

ESCUADERO, N.; FERREIRA, S. R.; LOPEZ-MOYA, F. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Biology*, v.120, p. 572-585, 2016.

ESTEVES, I.; PETEIRA, B.; ATKINS, S. D.; MAGAN, N.; KERRY, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*, v. 113, p. 867-876, 2009.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 793-796, 1995.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian Blue Color in the determination of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p. 801-805, 1992.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, p. 676-684, 2013.

HEUSSEN, C AND DOWDLE, EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, v. 102, p.196-202, 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos

químicos e físicos para análise de alimentos. IMESP, p.33, 1985.

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil*, v. 205, p. 25-44, 1998.

KERRY, B. R. & BOURNE, J. M. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science*, v. 47, p. 69-75, 1996.

KPOMBLEKOU-A, K. & TABATABAI, M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, v.158, p. 442-453, 1994.

KRIJGER, J. J.; THON, M. R.; DEISING, H. B.; WIRSEL, S. G. R. Compositions of fungal secretomes indicate a greater impact of phylogenetic history than lifestyle adaptation. *BMC Genomics*, v. 15, p. 1-18, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.

LARRIBA, E.; JAIME, M. D. L. A.; CARBONELL-CABALLERO, J.; CONESA, A.; DOPAZO, J.; NISLOW, C.; MARTÍN-NIETO, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 65, p. 69-80, 2014.

LI, Z.; BAI, T.; DAI, L.; WANG, F.; TAO, J.; MENG, S.; HU, Y.; WANG, S.; HU, S. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-8, 2016.

MACIÁ-VICENTE, J.G.; JANSSON, H.B.; TALBOT, N.J.; LOPEZ-LLORCA, L.V. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist*, v.182, p. 213-228, 2009.

MARRA, L. M.; DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; SOARES, C. R. F. S.; DE LIMA, J. M.; OLIVARES, F. L.; MOREIRA, F. M. S. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, p. 367-375, 2015.

MARTIN, K.; MCDUGALL, B. M.; MCILROY, S.; JAYUS; CHEN, J.; SEVIOUR, R. J. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal  $\beta$ -(1,3)- and  $\beta$ -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, p. 168-192, 2007.

MAUHLIN, T.H.; KERRY, B.R.; HIRSCH, P.R. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the intraspecific level. *Mycological Research*, v. 108, p. 161-169, 2004.

MEENA, P.; TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; JHA, A. Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, p. 210-216, 2013.

MEUDT, W.J. & GAINES, T.P. Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase enzymes. I. Colorimetric determination of indole-3-acetic acid oxidation products. *Plant Physiology*, v. 42, p. 1395-1399, 1967.

MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; PARIZZI, L. P.; RINCONES, J.; COTOMACCI, C.; CARRARO, D. M.; CUNHA, A. F.; CARRER, H.; VIDAL, R. O.; ESTRELA, R. C.; GARCÍA, O.; THOMAZELLA, D. P. T.; DE OLIVEIRA, B. V.; PIRES, A. B. L.; RIO, M. C.; ARAÚJO, M. R. R.; DE MORAES, M. H.; CASTRO, L. A. B.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, M. S.; NETO, J. P. M.; NETO, A. G.; BARBOSA, L. V.; GUILTINAN, M. J.; BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics*, v. 9, p. 1-25, 2008.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; PARK, J.O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-

parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and development of root-rot. *Soil Biol Biochem*, v. 37, p. 1229-1235, 2005.

MONTEIRO, T.S.A. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia de Flagrans* (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa, p. 47-49, 2013.

MONTEIRO, T.S.A.; LOPES, E.A.; EVANS, H.C.; FREITAS, L.G. Interactions Between *Pochonia chlamydosporia* and Nematodes. In: MANZANILLA-LÓPEZ, R.H. & LOPEZ-LLORCA, L.V. (Eds). *Perspectives in Sustainable Nematode Management Through Pochonia chlamydosporia Applications for Root and Rhizosphere Health*. Springer International Publishing, p.85, 2017.

MORTON, C. O.; HIRSCH, P. R.; PEBERDY, J. P.; KERRY, B. R. Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*, v. 107, p. 38-46, 2003.

MORTZ, E.; KROGH, T. N.; VORUM, H.; GÖRG, A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, v. 1, p. 1359-63, 2001.

MUTHULAKSHMI, M.; KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, S.; ANITA, B. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. *Journal of Biopesticide*, v.5, p. 243-245, 2012.

NAHAS, E. Control of acid phosphatases expression from *Aspergillus niger* by soil characteristics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 58, p. 658-666, 2015.

NAIK, S. K.; MAURYA, S.; KUMAR, R.; SADHNA, K.; GAGRAI, S.; DAS, B.; KUMAR, S.; BHATT, B. P. Inorganic phosphate solubilization by phosphate solubilizing fungi isolated from acidic soils. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 4310-4316, 2013.

NARSIAN, V. & PATEL, H.H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 32, p. 559-565, 2000.

NASU, E.G.C. Tratamento de sementes de soja e algodão com *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* e histologia na interação tritrófica (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa, p.89, 2013.

NETO, Y.A.A.H. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum* (Dissertação). Universidade de São Paulo, p. 49-51, 2012.

NORMANLY, J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, p. 1-17, 2010.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

OTEINO, N.; LALLY, R. D.; KIWANUKA, S.; LLOYD, A.; RYAN, D.; GERMAINE, K. J.; DOWLING, D. N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-9, 2015.

PIECK, M.; YUAN, Y.; GODFREY, J.; FISHER, C.; ZOLJ, S.; VAUGHAN, D.; THOMAS, N.; WU, C.; RAMOS, J.; LEE, N.; NORMANLY, J.; CELENZA, J. L. Auxin and tryptophan homeostasis are facilitated by the ISS1/VAS1 aromatic aminotransferase in *Arabidopsis*. *Genetics*, v. 201, p. 185-199, 2015.

PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; MCDUGALL, B.M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 178-190, 1993.

PREMONO, M.E.; MOAWAD, A.M.; VLEK, P.L.G. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian journal of crop science*, v. 11, p.13-23, 1996.

PRICE, M. L. & BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 25, p. 1268-1273, 1977.

RADHA,S.; SRIDEVI, A.; HIMAKIRANBABU, R.; NITHYA,V.J.; PRASAD, N. B. L.; NARASIMHA, N. Medium Optimization for acid protease production from *Aspergillus sp* under solid state fermentation and mathematical modelling of protease activity. v. 2, p. 6-16, 2012.

RONNE, H. Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, v. 11, p. 12-17, 1995.

ROSSO, L. C.; COLAGIERO, M.; SALATINO, N.; CIANCIO, A. Observations on the effect of trophic conditions on *Pochonia chlamydosporia* gene expression. *Annals of Applied Biology*, v. 164, p. 232-243, 2014.

SATYAPRAKASH, M.; NIKITHA, T.; REDDI, E. U. B.; SADHANA, B.; VANI, S. S. Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, p. 2133-2144, 2017.

SIDDIQUI, I. A.; ATKINS, S. D.; KERRY, B. R. Relationship between saprotrophic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. *Annals of Applied Biology*, v. 155, p. 131-141, 2009.

SILVA, J. G. *Pochonia chlamydosporia* para o manejo de *Meloidogyne javanica* e promoção de crescimento em mudas de bananeira ‘prata-anã’(Dissertação). Universidade Federal de Viçosa, p. 11-12, 2016.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, v. 299, p. 152-178, 1999.

SORCE, C.; LOMBARDI, L.; GIORGETTI, L.; PARISI, B.; RANALLI, P.; LORENZI, R.

Indoleacetic acid concentration and metabolism changes during bud development in tubers of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *Journal of Plant Physiology*, v. 166, p. 1023-1033, 2009.

SOUSA, C.B. Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas (Dissertação). Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 38, 2010.

SUKHOVA, L. S.; MACH, I.; EDER, J.; BIBIK, N. D. Changes in the levels of free IAA and cytokinins in potato tubers during dormancy and sprouting. *Biologia plantarum*, v. 35, p. 387-391, 1993.

VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F. J.; ORNAT, C.; GALEANO, M. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology*, v. 52, p. 521-528, 2003.

WANG, X.-X.; HOFFLAND, E.; FENG, G.; KUYPER, T. W. Phosphate Uptake from Phytate Due to Hyphae-Mediated Phytase Activity by Arbuscular Mycorrhizal Maize. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1-8, 2017.

WARD, E.; KERRY, B. R.; MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; MUTUA, G.; DEVONSHIRE, J.; KIMENJU, J.; HIRSCH, P. R. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcpl* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: Implications for nematode biocontrol. *PLoS ONE*, v. 7, p.1-12, 2012.

ZAVALA-GONZALEZ, E. A.; ESCUDERO, N.; LOPEZ-MOYA, F.; ARANDA-MARTINEZ, A.; EXPOSITO, A.; RICAÑO-RODRÍGUEZ, J.; NARANJO-ORTIZ, M. A.; RAMÍREZ-LEPE, M.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology*, v. 166, p. 472-483, 2015.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 49, p. 2722-2726, 2001.

## CONCLUSÕES GERAIS

Com a metodologia adotada para o fracionamento do extrato bruto de *Monacrosporium thaumasium* não foi possível identificar compostos nematocidas produzidos pelo fungo. No entanto, foi identificado que compostos do extrato do farelo de trigo possuem ação nematocida. Logo, o efeito nematocida observado nas frações provavelmente é devido aos compostos do farelo de trigo.

*Pochonia chlamydosporia* é capaz de secretar diferentes compostos. O cultivo do fungo em arroz proporcionou a produção de proteases e fosfatases. Esse microrganismo é capaz de solubilizar fosfato tricálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) devido a produção de ácidos orgânicos e alguns isolados secretam auxina.