

Uso do Polissacarídeo Extraído do Fungo *Tremella fuciformis* Berk como Controle da Mancha Foliar em Plantas de Cevada

Erna Elisabeth Bach¹; Keisy Menezes da Silva²; Juliana Rodrigues Nascimento²; Mariana Yuri Soares Motoshima²; Jorge Augusto da Silva Junior², Edgar Matias Bach Hi³; Nilsa Sumie Yamashita Wadt¹

Resumo

Exopolissacarídeo (EPS) foi extraído do fungo *Tremella fuciformis* desenvolvido em meio de cultura contendo sementes de sorgo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do polissacarídeo da *Tremella* como possível indutor de resistência no modelo de controle de doença foliar da cevada. Os resultados demonstraram que as concentrações de 4 mmol e 2 mmol de polissacarídeo apresentaram proteção variando de 70% a 85% enquanto a de 1 mmol foi de 65% a 68%. Em relação a concentração de proteínas e fenóis, extratos de plantas de cevada com maior proteção apresentaram maior quantidade de proteínas e menor de fenóis quando comparado com plantas infectadas, demons-

¹ Diretoria da Saúde, Depto. Biomedicina (Uninove), São Paulo, SP.

² IC, Graduação em Biomedicina (Uninove), São Paulo, SP.

³ Unilus, Núcleo Acadêmico em Bioquímica Experimental (Nabex), Santos, SP.

trando efeito metabólico na planta. Assim, o EPS do fungo pode ser usado como indutor de resistência na planta de cevada contra *Bipolaris sorokiniana*.

Palavras chaves: polissacarídeo, *Tremella fuciformis*, indutor de resistência, cevada.

Introdução

Tremella fuciformis (família Tremellaceae, ordem Tremellales, classe Basidiomycetes) é provavelmente um dos fungos mais bonitos que crescem em áreas tropicais e subtropicais. Foi encontrado no Brasil, entretanto, desenvolvido artificialmente em Taiwan, China e em outros locais da Ásia (URBEN, 2002, 2010). Esses cogumelos têm sido descritos por vários autores como importantes na nutrição e/ou terapia para controle de doenças humanas (MANZI et al., 2001; ZHANG et al., 2002, 2009).

T. fuciformis é conhecido como “auricularia branca” ou “fungo gelatinoso branco”. Os corpos de frutificação são difíceis de obter no Brasil e assim estes fungos são preparados no substrato (HANG et al., 2001; URBEN, 2002) surgindo assim os polissacarídeos (ZHU et al., 2012) com diferentes atividades biológicas. SU-YUN et al. (2010) demonstraram que estruturas químicas do polissacarídeo do corpo de frutificação, esporo e micélio apresentaram estruturas similares. O polissacarídeo obtido é heteropolissacarídeo com cadeia D-manana e ligação α -(1→3).

Baseando em goma xantana como indutor de resistência contra manchas foliares em trigo (BACH et al., 2003), o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do polissacarídeo da *Tremella* como possível indutor de resistência contra doença mancha foliar.

Material e Métodos

Preparação do polissacarídeo

O isolado da *Tremella fuciformis* foi proveniente da Embrapa (Brasília, DF) e cultivado em meio de cultura de batata-ágar-dextrose (BDA) por 8 dias e transferido para sacos plásticos contendo sementes de sorgo previamente cozidos e esterilizados. Os sacos foram incubados por 45 dias em câmara com temperatura controlada ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) e escuro. Para produção de polissacarídeo, o meio de cultura envolveu 100 g de sementes de sorgo (variedade 308 da Embrapa) pré-cozidas em água. As sementes foram trituradas na presença de 400 mL de água e, submetido a cozimento novamente. A mistura foi filtrada em gaze, algodão e completado o volume a 500 mL de água e 0,5 g de Agar. O meio foi transferido para frascos e esterilizado. Depois de frio o fungo foi repicado e, mantidos por 20 dias em temperatura controlada ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) e escuro. Após o período o exopolissacarídeo (EPS) foi removido em água, observado presença de esporos, centrifugado (3.000 xg/10 min.) e precipitado o polissacarídeo com álcool 70%. Solvente foi evaporado (restando apenas água) e a beta-glucana foi determinada pelo método de Lever (LEVER, 1972) envolvendo enzima beta-glucanase (Sigma). Padrão no teste foi usado glicose e laminarina onde uma unidade de enzima pode liberar $1\text{ }\mu\text{M}$ de glicose/min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (VAN HOOFF et al., 1991). Para determinação de açúcar total foi usado o método de Antrona (DISCHE et al., 1954, DISCHE, 1962).

Isolado de *Bipolaris sorokiniana* e teste biológico

O isolado de *Bipolaris sorokiniana* foi obtido da Fundação Agrária de Guarapuava no Paraná e, mantidos em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). A suspensão de esporos (conídios) foi preparada colocando 10 mL de água destilada estéril com 0,05% de Tween 20 (poli-oxietilen sorbitan monolauret, Sigma Chemical Co.) nas placas de

Petri contendo as culturas e, retirando-se os esporos com alça de Dri-galsky. A suspensão foi filtrada em gaze e, contado os esporos, ajustando em hematocítômetro até a concentração de 2×10^5 conídios/mL.

Preparação de plantas de cevada e tratamentos

As sementes de cevada (BRS Brau) foram fornecidas pela Fundação Agrária de Guarapuava, Paraná, sendo semeadas em vasos, mantidas em casa de vegetação à temperatura ambiente, até o estágio 5 da escala de Feekes-Large (LARGE, 1954). Na composição do substrato foi utilizada uma parte de solo vermelho, oriundo do Paraná e uma parte de terra vegetal adubada com NPK (na formulação 10-10-10) além de micronutrientes marca Ouro Verde (de acordo com a especificação do produtor).

Grupos de dez plantas foram usados nos testes biológicos para cada tratamento, em três repetições. Em todos os tratamentos foram aspergidos cerca de 10 mL da suspensão de conídios ou, solução do extrato (indutor) ou ainda, água.

Os tratamentos foram: a) sadia – plantas aspergidas com água; b) tratadas com EPS Tremella (indutor) – plantas aspergidas com EPS; c) inoculadas com o patógeno – plantas aspergidas com suspensão do isolado; d) tratadas com indutor e após 24 horas – inoculadas com suspensão de conídios; e) idem ao grupo d, entretanto, após 48 horas; f) idem ao grupo d, entretanto, após 72 horas. Todos os grupos foram repetidos para três concentrações do EPS como 1 mmol, 2 mmol e 4 mmol. As plantas dos grupos d, e, f, foram inicialmente aspergidas com indutor sendo que após 24h, 48h e, 72h, sob condições de temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 horas (luz fluorescente $7,35 \text{ W/m}^2$), as folhas foram inoculadas, por aspersão, com as suspensões de conídios dos isolados. Durante as primeiras 24h após a inoculação do patógeno, as plantas foram mantidas em câmara úmida (100% UR), temperatura ambiente e escuro. Em seguida, o material foi transferido

para casa de vegetação e mantido em condições de temperatura e luminosidade ambiente. A proteção das plantas foi avaliada 10 dias após a inoculação do patógeno de acordo com Bach et al. (2003, 2012, 2015).

Um grama de folhas de todos os tratamentos foi submetido à extração com 5 mL de tampão fosfato pH7 0,1 mol/L e depois quantificada a proteína pelo método de Lowry (LOWRY, 1951) e, o total de fenóis analisado através do método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLS, 1959).

Todos os resultados obtidos nos experimentos foram analisados por teste Assistat envolvendo Anova e teste T Student's.

Resultados e Discussão

Análise da *Tremella fuciformis*

A composição química e o processo de extração do polissacarídeo dos corpos de frutificação não estão completamente descritos. WU et al. (2008) demonstraram que a estrutura química consiste de cadeia linear de D-manana com ligação $\alpha(1\rightarrow3)$; onde a cadeia é formada de ácido glucurônico, xilose e fucose. A cadeia de D-xilose são ligadas ao C-2 da cadeia linear por ligação $\beta(1\rightarrow2)$. A taxa de manose, fucose, xilose e ácido glucurônico é de 9:1:4:3 o que perfaz 17,6% de ácido glucurônico (DE BAETS; VANDAMME, 2001; GAO et al., 1996, 1997; KAKUTA et al., 1979; KHONDKAR, 2009; TSING, 2006; WU et al., 2008).

Os resultados do EPS obtido apresentou açúcar total no total de 28 mmol e, pelo 153,6 mg de beta-glucana/mL. Os esporos encontrados são de formato elipsoidal com 7-9 x 6-7 μm , liso, hialino de acordo com Berkeley (1856). Em relação ao polissacarídeo este apresentou cor branca após precipitação.

Indução de proteção e análises

Para determinar a concentração ideal do EPS foram usadas três soluções sendo 1 mmol, 2 mmol e 4 mmol sendo que as duas primeiras foram baseadas em teste de animal para induzir controle de diabetes. Os resultados obtidos com tratamentos de 2 mmol e 4 mmol foram semelhantes na proteção (variando de 70% a 85%). Já o tratamento com 1 mmol, a porcentagem de proteção foi menor com variação entre 65% a 68% (Tabela 1). Para futuros tratamentos poderá ser utilizada a concentração de 2 mmol.

A proteção vem correlacionada com quantidade de proteína e fenol apresentada nos extratos isto é; de acordo com o intervalo de tempo de intervalo entre indutor e provocador, os extratos das plantas com maior proteção apresentaram maior quantidade de proteína e menor de fenol. Comparando com o tratamento de 1 mmol a concentração de proteína foi bem menor a dos outros tratamentos e, em relação ao fenol a concentração foi menor (Tabela 1). Os resultados envolvendo a indução com o intervalo de tempo vieram ao encontro com os encontrados por Guzzo et al. (1993), Bach et al. (2003, 2012), Castro e Bach (2004).

A porcentagem de proteção encontrada com tratamento da goma xantana em plantas de cevada chegou até aproximadamente 100% enquanto o EPS da Tremella promoveu até 85%. O EPS não apresenta toxicidade além de apresentar efeito no controle de glicemia (BACH et al., 2015).

Tabela 1. Porcentagem de proteção e concentração de proteínas e fenóis encontrados em plantas de cevada (BRS Brau) tratadas com EPS de *Tremella fuciformis*.

Concentração do EPS	Tratamento	% proteção⁽¹⁾	mg protein⁽²⁾	mg fenol⁽²⁾
Controle	Tremella	x	0,395 b	0,398
4mmol	Tremella 24h	71 b	0,400 b	0,362 b
	Tremella 48h	82 b	0,435 b	0,360 b
	Tremella 72h	86 b	0,534 b	0,320 b
2mmol	Tremella 24h	70 b	0,392 b	0,365 b
	Tremella 48h	80 b	0,431 b	0,353 b
	Tremella 72h	85 b	0,520 b	0,308 b
1mmol	Tremella 24h	65 b	0,389 b	0,410 b
	Tremella 48h	72 b	0,380 b	0,380 b
	Tremella 72h	78 b	0,420 b	0,363 b
	Sadia	x	0,640	0,295
	Infectada	0 a	0,387 a	0,461 a

⁽¹⁾ Porcentagem de proteção seguidas por letra b, são significativamente diferentes do controle (plantas infectadas) pelo teste T ($p < 0,05$). Os números representam média de um total de 50 folhas/tratamento.

⁽²⁾ Quantidade de proteínas e fenóis seguidas por letra b, são significativamente diferentes do controle e plantas infectadas, pelo teste T ($p < 0,05$ e $p < 0,01$).

Conclusão

Plantas de cevada (BRS Brau) quando tratadas com EPS do cogumelo *Tremella fuciformis*, demonstraram proteção contra o patógeno *Bipolaris sorokiniana* correlacionada com aumento de proteína e diminuição de fenol, podendo ser utilizada no tratamento em campo.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio (Processo 474681/2013); Dra. Arailde Urben (Embrapa – Sede) e Edison Souza por liberar isolados de *Tremella fuciformis*. Ao Flávio Dessaune Tardin, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, por ceder sementes de sorgo e, ao Noemir Antoniazzi por ceder sementes de cevada.

Referências

BACH, E. E.; BARROS B. C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivated conidial suspension, **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 7/8, p. 411-418, 2003.

BACH, E. E.; MARCONDES, M. C. L.; PATRICIO, G. F.; ESQUERDO, K. F.; CARDOSO, V.; WADT, N. S. Y. Aqueous extract of leaves from *Bauhinia variegata* used in barley plants to protect against *Bipolaris sorokiniana*. **Agricultural Research and Reviews**, Victoria Island, v. 1, n. 3, p. 71-79, 2012.

BACH, E. E.; COSTA, S. G.; OLIVEIRA, H. A.; SILVA JUNIOR, J. A.; SILVA, K. M.; MARCO, R. M.; HI, E. M. B.; WADT, N. S. Y. Use of polysaccharide

extracted from *Tremella fuciformis* Berk for control diabetes induced in rats. **Emirate Journal of Food and Agriculture**, Al Ain, UAE, v. 27, n. 7, p. 585-591, 2015.

BERKELEY, B. *Tremella fuciformis* Berkeley. **Hooker's Journal of Botany and Kew Garden Miscellany**, London, v. 8, p. 277-288, 1856.

CASTRO, O. L.; BACH, E. E. Increased production of b-1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystems treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 2, p. 165-169, 2004.

DE BAETS, S.; VANDAMME, E. J. Extracellular *Tremella* polysaccharides: structure, properties and applications. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 23, n. 17, p. 1361-1366, 2001.

DISCHE, Z. A specific color reaction for glucuronic acid. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 478-512, 1962.

DISCHE, Z.; WEIL, R.; LANDSBERG, E. A New color reaction for keto acids and other carbonyl compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore v. 208, n. 1, p. 23-28, 1954.

GAO, Q. P.; KILLIE, M. K.; CHEN, H. Characterization and cytokine-stimulating activities of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 63, n. 5, p. 457-460, 1997.

GAO, Q. P.; JIANG, R. Z.; CHEN, H. Q. Characterization and cytokine stimulating activities of heteroglycans from *Tremella fuciformis*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 62, n. 4, p. 297-302, 1996.

GUZZO, S. D.; BACH, E. E.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as induceres of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 139, n. 2, p. 119-128, 1993.

HANG, H. L., CHAO, G. R., CHEN, C. C., MAU, J. L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorate* and *Cordyceps militaris* mycelia. **Food Chemistry**, Barking, v. 74, n. 1, p. 203-207, 2001.

- KAKUTA, M.; SONE, Y.; UMEDA, T. Comparative structural studies on acidic heteropolysaccharides isolated from 'Shirokikurage', fruit body of *Tremella fuciformis* Berk, and the growing culture of its yeast-like cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 43, n. 8, p. 1659-1668, 1979.
- KHONDKAR, P. Composition and partial structure characterization of *Tremella* polysaccharides. **Mycobiology**, Seoul, v. 37, n. 4, p. 286-294, 2009.
- LARGE, E. C. Growth stages in cereals. Illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, London, v. 3, n. 4, p. 128-129, 1954.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, n. 1, p. 273-279, 1972.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L.; AGUZZI, A. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, Barking, v. 73, n. 3, p. 321-325, 2001.
- SU-YUN, M. A.; LIANG, H. E.; LI-FEN, Y. A. O. Research advances on structural characteristics and bioactivity of *Tremella fuciformis* polysaccharides. **Food Science**, Osaka, v. 31, n. 23, p. 411-416, 2010.
- SWAIN, R.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.
- TSING, H. U. A. Structure and Biological Activity of *Tremella fuciformis* Polysaccharide. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Nanquim, v. 1, n. 1, p. 20-35, 2006.
- URBEN, A. F. Importância do uso de cogumelos: aspectos nutricionais e funcionais. In: ENCONTRO FRANCO BRASILEIRO DE BIOCÊNCIA E BIOTECNOLOGIA, 2002, Brasília, DF. **Alimentos funcionais e nutracêuticos**: resumos das palestras. Brasília, DF: Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 6-7. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 85). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/23487/1/doc085.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2014.

URBEN, A. F. Banco de cogumelos para uso humano: cogumelos coletados no Brasil e perspectivas de uso. In: GERENUTTI, M. (Org.). **Cogumelos medicinais**: aspectos de cultivo e aplicações. Sorocaba: EDUNISO, 2010. p. 47-60.

VAN HOOFF, A.; LEYMAM, J.; SCHEFFER, H. J.; WALTON, J. D. A single beta-1,3-glucanase secreted by the maize pathogen *C. carbonum* acts by an exolytic mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 39, n. 4, p. 259-267, 1991.

WU, Y.; SHAN, L.; YANG, S. Identification and antioxidant activity of melanin isolated from *Hypoxylon archeri*, a companion fungus of *Tremella fuciformis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 217-221, 2008.

ZHANG, R. H.; LI, X.; FADEL, J. G. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology**, Austrália, v. 82, p. 277-284, 2002.

ZHANG, Z. C.; LIAN, B.; HUANG, D. M.; CUI, F. J. Compare activities on regulating lipid-metabolism and reducing oxidative stress of diabetic rats of *Tremella aurantialba* broth's extract (TBE) with Its Mycelia polysaccharides (TMP). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 1, p. H15-21, 2009.

ZHU, H.; TIAN, B.; LIU, W.; ZHANG, S.; CAO, C.; ZHANG, Y.; ZOU, W. A three-stage culture process for improved exopolysaccharide production by *Tremella fuciformis*. **Bioresource Technology**, Austrália, v.116, p. 526-528, 2012.