



Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo

César Júnior Bueno¹, Ivan Herman Fischer², Daniel Dias Rosa³ & Edson Luiz Furtado³

¹Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios APTA, Centro Experimental Central, Instituto Biológico, 13001-970, Campinas, SP, Brasil; ²Agência Paulista Tecnologia Agronegócios APTA, Unidade de Bauru, 17030-000, Bauru, SP, Brasil; ³Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista UNESP, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil

Autor para correspondência: César Júnior Bueno, e-mail: cjbueno@biologico.sp.gov.br

RESUMO

Uma das principais doenças do maracujazeiro, na maioria dos estados produtores do Brasil, é a podridão do colo, causada por *Fusarium solani*. Pouco se sabe a respeito da fisiologia deste patógeno do maracujazeiro amarelo, principalmente quanto à produção de enzimas extracelulares. O objetivo do presente trabalho foi verificar, em meios de cultura individuais e apropriados, a produção das enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, proteases (caseinase e gelatinase), lacase (oxidase) e catalase por isolados de *F. solani*, provenientes de maracujazeiro amarelo. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema de dois fatores (nove isolados versus sete enzimas), com três repetições. Todos os isolados de *F. solani* produziram, de maneira semiquantitativa, as enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, caseinase (protease) e lacase (oxidase). No entanto, a quantidade produzida de cada enzima foi significativamente diferente entre os isolados. As enzimas extracelulares gelatinase (protease) e catalase foram produzidas em pouca quantidade e de maneira igual por todos os isolados do fungo.

Palavras-chave: *Passiflora* sp., atividade enzimática, fungos de solo, patógeno de planta.

ABSTRACT

Production of extracellular enzymes by *Fusarium solani* from yellow passion fruit

In most Brazilian producer states, one of the main diseases of the passion fruit is collar rot caused by *Fusarium solani*. Little is known about the physiology of this pathogen from yellow passion fruit, which mainly involves the production of extracellular enzymes. The objective of this work was to verify, in individual and appropriate culture media, the production of the extracellular enzymes amylase, lipase, cellulase, proteases (caseinase and gelatinase), lacase (oxydase) and catalase by isolates of *F. solani* from yellow passion fruit. The experimental design adopted was an entirely randomized two-factor scheme (nine isolates and seven enzymes) with three repetitions. All the isolates of *F. solani* produced, in a semi-quantitative manner, the extracellular enzymes amylase, lipase, cellulase, caseinase (protease) and lacase. However, the amount of each enzyme produced was significantly different among the isolates. The extracellular enzymes gelatinase (protease) and catalase were produced in a small amount and in an equal manner by all the isolates of the fungus.

Keywords: *Passiflora* sp., enzymatic activity, soil-borne plant pathogens.

Uma das principais doenças do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), na maioria dos estados produtores do Brasil, é a podridão do colo, causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Essa doença causa significativo decréscimo na produtividade e constantes migrações da cultura para regiões livres do patógeno. Os sintomas consistem em uma leve murcha dos ponteiros, acompanhada de alteração na coloração das folhas para um verde-pálido, ocorrendo, posteriormente, murcha drástica, desfolha e morte das plantas, devido ao completo anelamento necrótico do colo da planta. Sob condições de elevada umidade, peritécios do patógeno de coloração avermelhada formam-se sobre o colo lesionado da planta (Fischer et al., 2005a).

Pascholati (1995) relata que para um patógeno infectar uma planta é preciso que o mesmo consiga penetrar

e colonizar os tecidos do seu hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta. Para isso, o patógeno utiliza-se de substâncias tais como enzimas, toxinas e hormônios. Portanto, as enzimas estão entre as substâncias relacionadas com o mecanismo da patogênese. Além da patogênese, a análise da produção enzimática de fungos, em meio de cultura sólido, é descrita como um método simples e rápido para constatar variantes genéticas em uma população, pela presença ou ausência de enzimas específicas (Bocchese et al., 2003).

Pouco se sabe a respeito da fisiologia de *F. solani* do maracujazeiro amarelo, principalmente quanto à produção de enzimas extracelulares. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar, em meios de cultura individuais e apropriados, a produção das enzimas extracelulares amilase,

lipase, celulase, proteases (caseinase e gelatinase), lacase (oxidase) e catalase por isolados de *F. solani*, provenientes de maracujazeiro amarelo.

O isolamento do fungo foi realizado a partir de plantas de maracujazeiro amarelo sintomáticas, provenientes de diferentes localidades do Estado de São Paulo e uma do Estado do Rio de Janeiro. Pequenos fragmentos da região do colo, desinfestados superficialmente com álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio a 2%, seguido de lavagens em água destilada esterilizada, foram transferidos para placas de Petri, contendo o meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido de 0,05 mg/mL de oxitetraciclina. As placas foram mantidas em estufa tipo BOD, a 25°C, no escuro, por seis a oito dias. Após a identificação e purificação das colônias de *F. solani* (Booth, 1977), nove isolados obtidos tiveram a patogenicidade confirmada através de inoculações no colo de plântulas de maracujazeiro amarelo sadias (Fischer et al., 2005b). Os isolados foram depositados na micoteca da APTA/Instituto Biológico – Centro Experimental Central (CEIB) com as seguintes denominações: CEIB 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 (Estado de São Paulo) e 09 (Rio de Janeiro). O inóculo do fungo foi produzido pela transferência de discos de 5 mm de colônia de cada isolado do fungo para placas de Petri, contendo meio BDA, as quais foram mantidas em estufa tipo BOD, a 25°C, na ausência de luz, por seis a oito dias.

A produção de amilase foi determinada em nutriente ágar (NA), contendo 0,3% de amido solúvel, seguindo metodologia descrita por Coon et al. (1957) citados por Bastos (2005). Para auxiliar na detecção da atividade amilolítica, adicionou-se em cada placa 10mL de solução a base de iodo a 1%. A atividade celulolítica foi verificada em meio de sais minerais-ágar suplementado com celulose Whatman n°1 (Lewis, 1988 citado por Bastos, 2005). A produção de lipase foi constatada em meio de Sierra (1957) citado por Bastos (2005), contendo Tween 80 e 0,001% de Rodamina B. A atividade de fenol-oxidases (lacase) foi vista em meio BDA suplementado com 0,2% de ácido gálico, segundo metodologia de Nobles (1958) modificada. A atividade da catalase foi constatada em meio BDA com adição de solução de peróxido de hidrogênio a 3% sobre a cultura fungica, segundo metodologia modificada de Shin & Kim (1998). A atividade proteolítica (ou proteases) foi constatada através da verificação da produção de duas enzimas, a caseinase e a gelatinase. A caseinase foi verificada em meio caseína-ágar contendo 1% de caseína como fonte de carbono, acrescido, após 96 h de incubação com o fungo, de 5,0 mL de solução de ácido acético a 5% (Stamford et al., 1998), enquanto que a gelatinase em meio nutriente suplementado com 150 g/L de gelatina (Hankin & Anagnostakis, 1975 citados por Bocchese et al., 2003). Após o preparo dos meios, um disco de meio BDA com cada isolado do fungo foi inoculado no centro de cada placa. O tratamento controle dos testes (testemunha) consistiu de meios contendo discos de meio de cultura (BDA) sem os isolados do fungo.

A avaliação das enzimas amilase, celulase, lipase, protease (caseinase) e lacase (oxidase) consistiu na medição

de dois diâmetros ortogonais da colônia e do respectivo halo. A atividade enzimática das enzimas citadas foi estimada semiquantitativamente usando um índice enzimático, que expressa a relação do diâmetro médio da colônia pelo diâmetro médio do halo. Com isso, os isolados com maior índice são os que possuem menor atividade enzimática (Bocchese et al., 2003). Seguindo Bastos (2005), uma estimativa subjetiva da produção das enzimas gelatinase (protease) e catalase foi mensurada por meio de símbolos, baseando-se na intensidade da coloração formada no meio: +++ (intensa); ++ (moderada); + (fraca) e – (ausência).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema de dois fatores (nove isolados versus sete enzimas), com três repetições, sendo a parcela (repetição) representada por uma placa de Petri contendo o meio mais um isolado do fungo. Os dados obtidos foram submetidos à análise paramétrica e as médias das repetições dos isolados foram comparadas entre si para cada enzima por meio da aplicação do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Todos os isolados do fungo produziram as enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, caseinase (protease) e lacase (oxidase). No entanto, a quantidade produzida de cada enzima foi significativamente diferente entre os isolados (Tabela 1).

Especificamente com relação à amilase, os isolados 01, 02, 05, 06 e 09 apresentaram, de maneira significativamente semelhante entre si, grande atividade desta enzima no meio de cultura. Os isolados 03, 07 e 08, de maneira semelhante, demonstraram uma atividade enzimática intermediária, enquanto que o isolado 04 foi o que apresentou a menor produção desta enzima (Tabela 1). Oyeka & Okubo (1996) constataram que a maioria dos fitopatógenos ocorrendo em plantas na Nigéria, incluindo *F. solani*, produz as enzimas amilase, celulase e proteases. Os autores sugerem que a atividade enzimática dos patógenos possa estar relacionada com as doenças nas plantas. A atividade das enzimas pectinase, poligalacturonase, celulase e α -amilase foi verificada em 11 espécies de fitopatógenos, *Alternaria citri*, *A. alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium roseum*, *F. solani*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichothecium roseum* e duas espécies de *Erwinia carotovora*, provenientes de vegetais e frutas com sintomas de podridão. Alta atividade de α -amilase foi registrada em *A. niger*, *R. stolonifer* e *A. alternata*, enquanto que nos demais fitopatógenos não se detectou atividade dessa enzima (El-Shaieb & Malibari, 1995). Singh & Saxena (1989) descreveram tanto *in vitro* como *in vivo* a produção da enzima amilase por isolados de *F. solani* de couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*) e constataram que isolados altamente virulentos exibiram atividade máxima da enzima amilase e mínima da protease.

Os isolados 01, 02 e 09 apresentaram, de maneira semelhante, maior atividade da enzima lipase. Os isolados 03, 07 e 08 seguido pelos isolados 05 e 06 apresentaram atividade enzimática semelhante entre si, porém em níveis intermediários, enquanto que o isolado 04 foi o que apresentou a menor atividade da enzima em questão. Maia et al. (2003)

relataram que diferentes espécies de *Fusarium*, incluindo *F. solani*, têm sido descritas com capacidade para produzir a enzima extracelular lipase. Chander & Klostermeyer (1983) observaram variações entre diferentes isolados de *F. solani* quanto à produção da enzima lipase, em meio de cultura específico, incubado a 28°C e agitado a 120 rpm por quatro dias. No presente trabalho, os isolados de *F. solani* de maracujazeiro amarelo, também apresentaram variação entre si quanto à produção da enzima lipase no meio de cultura utilizado (Tabela 1).

Com relação à enzima celulase, os isolados 01, 02, 06 e 09 produziram, de maneira semelhante, maior quantidade desta enzima no meio de cultura. Numa condição intermediária e significativamente semelhante entre si, vêm os isolados 03, 05, 07 e 08. O isolado 04 do fungo foi o que apresentou a menor atividade desta enzima (Tabela 1). Além da descrição de Oyeka & Okubo (1996) a respeito da produção da enzima celulase por *F. solani*, Shihata et al. (1995) relataram que *F. moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. solani*, de ervilha (*Pisum sativum*), produzem pectinase e celulase tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Plântulas infectadas apresentaram maior atividade enzimática do que as sadias. As maiores atividades de pectinase e celulase foram detectadas em plântulas infectadas por *F. oxysporum* e as menores por *F. moniliforme* (Shihata et al., 1995).

Os isolados 02 e 09 mostraram maior atividade de lacase, enquanto que os isolados 01, 03, 07 e 08 atividade enzimática intermediária. Os isolados 04, 05 e 06 apresentaram a menor produção desta enzima (Tabela 1). Giese et al. (2004) descreveram que surfactantes, como o Tween 80, podem

aumentar a produção de algumas exoenzimas fúngicas, como a lacase, principalmente em basidiomicetos. Os isolados apresentaram atividade fenol-oxidase, pois produzem a enzima lacase (oxidase) (Tabela 1), porém o meio utilizado não foi suplementado com o Tween 80.

A enzima extracelular catalase foi produzida de maneira fraca e igual por todos os isolados do fungo (Tabela 1). Há relatos que a catalase e o ácido ascórbico são potentes antioxidantes, que quando adicionados em células de soja (*Glycine max*) são capazes de bloquear o acúmulo da fitoalexina gliceolina, induzida por *Verticillium dahliae*, sugerindo que a produção de catalase, pelo lado do patógeno, provavelmente é capaz de suprimir as respostas de defesa das plantas (Dixon et al., 1994). Garre et al. (1998) demonstraram que o fungo *Claviceps purpurea* produz a enzima catalase tanto em meio de cultura quanto durante a infecção em centeio (*Secale cereale*).

Todos os isolados do fungo *F. solani* produziram as proteases (caseinase e gelatinase). Com relação à caseinase, os isolados apresentaram atividade enzimática semelhante ao da enzima lipase, enquanto que a gelatinase foi estimada com uma produção fraca e igual por todos os isolados do fungo (Tabela 1). Além da descrição de Oyeka & Okubo (1996) a respeito da produção das enzimas proteases por *F. solani*, Olivieri et al. (2004) discutiram o papel dessas proteases produzidas por *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* como estratégia de colonização da batateira (*Solanum tuberosum*). Singh & Saxena (1989) descreveram tanto *in vitro* como *in vivo* a produção de proteases por *F. solani*

TABELA 1 - Produção de enzimas extracelulares por isolados de *Fusarium solani*, de maracujazeiro amarelo, em meios de cultura específicos

Isolados - CEIB ¹	Enzimas Extracelulares						
	Índice Enzimático (IE) ²					Símbolos ³	
	Amilase	Lipase	Celulase	Protease (caseinase)	Lacase (oxidase)	Protease (gelatinase)	Catalase
01	0,53 ⁴ a ⁵	0,45 a	0,45 a	0,48 a	0,70 b	+	+
02	0,50 a	0,41 a	0,43 a	0,46 a	0,57 a	+	+
03	0,65 b	0,58 b	0,60 b	0,62 b	0,70 b	+	+
04	0,93 c	0,91 d	0,92 c	0,92 d	0,92 c	+	+
05	0,53 a	0,74 c	0,56 b	0,75 c	0,91 c	+	+
06	0,45 a	0,66 c	0,46 a	0,68 c	0,88 c	+	+
07	0,60 b	0,53 b	0,54 b	0,56 b	0,68 b	+	+
08	0,66 b	0,59 b	0,61 b	0,63 b	0,63 b	+	+
09	0,55 a	0,47 a	0,49 a	0,51 a	0,54 a	+	+

¹Procedência dos isolados: 01, 05 e 06 (Pederneras SP, Faz. Ribeirão Grande); 02 (Bauru SP); 03 e 07 (Pederneras SP, Sítio Águas da Capivara); 04 (Jaú SP); 08 (Borborema SP) e 09 (Campos dos Goytacazes RJ); ²IE = diâmetro da colônia (cm) / diâmetro do halo formado (cm). Os isolados com maior índice são os que possuem menor atividade enzimática; ³+++ (intensa); ++ (moderada); + (fraca) e - (ausência de alteração de cor no meio de cultura); ⁴Média de três repetições; ⁵Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, segundo teste de Scott-Knott a 5%.

de couve-flor (*Brassica oleraceae* var. *botrytis*). Os autores associaram o papel das proteases e de outras enzimas com a murcha causada pelo fungo na cultura.

Seguindo o raciocínio de Bastos (2005), que estudou o perfil de produção de enzimas extracelulares do fungo *Crinipellis pernicioso*, a população de *F. solani*, de maracujazeiro amarelo, provavelmente, tem a capacidade de utilizar celulose, amido e lipídios como fontes de energia. Durante o período de incubação do fungo no hospedeiro, admite-se, em hipótese, que *F. solani* também libere enzimas (amilase, celulase, proteases e oxidase - lacase), que ativamente degradam os componentes presentes no tecido infectado do hospedeiro, que no caso é a região do colo do maracujazeiro. Gradualmente, os açúcares simples e aminoácidos aumentam e são utilizados como fontes de carbono pelo patógeno.

Nas condições do presente trabalho, conclui-se que os isolados de *F. solani*, de maracujazeiro amarelo, produzem as enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, proteases (caseinase e gelatinase), lacase (oxidase) e catalase. No entanto, a quantidade produzida de cada enzima é significativamente diferente entre os isolados, com exceção da gelatinase e catalase. Seguindo os comentários de Bocchese et al. (2003), não houve no presente trabalho destaque de uma enzima específica que pudesse ser característica da espécie *F. solani* do maracujazeiro amarelo. No entanto, o perfil enzimático obtido da população do fungo pode auxiliar em futuros trabalhos de caracterização.

REFERÊNCIAS

- Bastos CN (2005) Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 30:286-288.
- Bocchese CAC, Martinelli JA, Matsumura ATS, Federizzi LC, Prestes AM (2003) Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. *Fitopatologia Brasileira* 28:11-16.
- Booth C (1977) *Fusarium*: Laboratory guide to identification of the major species. Kew. Commonwealth Mycological Institute.
- Chander H, Klostermeyer H (1983) Production of lipase by *Fusarium solani* under various growth condition. *Scienas des Aliments* 3:938-943.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479-501.
- El-Shaieb MKZ, Malibari AA (1995) Enzymatic activities of soft rot causal organisms affecting vegetables and fruits in Saudi Arabia. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 40:293-304.
- Fischer IH, Kimati H, Rezende JAM (2005a) Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) (2005) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª. Ed. São Paulo SP. Ceres. pp. 467-474.
- Fischer IH, Lourenço AS, Martins MC, Kimati H, Amorim L (2005b) Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria haematococca*. *Fitopatologia Brasileira* 30:250-258.
- Garre V, Tenberge KB, Eising R (1998) Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: putative role in pathogenicity and suppression of host defense. *Phytopathology* 88:774-753.
- Giese EC, Covizzi LG, Dekker RFH, Barbosa AM (2004) Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 26:463-470.
- Maia MMD, Heasley A, Camargo de Moraes MM, Melo EHM, Moraes Júnior MA, Ledingham WM, Lima Filho JL (2001) Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology* 76:23-27.
- Nobles MK (1958) A rapid test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany* 36:91-99.
- Olivieri F, Zanetti ME, Oliva CR, Covarrubias AA, Casalongué CA (2004) Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 108:63-72.
- Oyeka CA, Okudo P (1996) Fungal agents of yam, fruit and vegetable rots in Nigeria. *African Journal of Mycology and Biotechnology* 4:71-78.
- Pascholati SF (1995) Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) Manual de fitopatologia. Vol.1 Princípios e conceitos 3a. Ed. São Paulo SP. Ceres. pp. 343-364.
- Shihata ZA, Abdou ES, Galal AA (1995) Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium* species in diseased cowpea plants and in vitro. *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 26:339-344.
- Shin K-Soo, Kim C-Jin (1998) Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* 20:569-572.
- Singh R, Saxena VC (1989) Pectinolytic, cellulolytic, amylase and protease production by three isolates of *Fusarium solani* variable in their virulence. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 19:22-29.
- Stamford TLM, Araujo JM, Stamford MP (1998) Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18:382-385.