

## NOTAS CIENTÍFICAS

# Produção *in vitro* de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira

Alice Elias<sup>1,2</sup>; Ana Beatriz Monteiro Ferreira<sup>1,3</sup>; César Júnior Bueno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Biológico / APTA. Rodovia Heitor Penteado, Km 03, Jardim das Palmeiras, Caixa Postal 70, 13092-543, Campinas-São Paulo-Brasil;

<sup>2 e 3</sup>Bolsistas do PIBIC-CNPq (Processo CNPq: 124149/2013-8) e CAPES, respectivamente.

Autor para correspondência: César Júnior Bueno (cjbueno@biologico.sp.gov.br).

Data de chegada: 25/11/2014. Aceito para publicação em: 04/05/2015.

10.1590/0100-5405/2044

### RESUMO

Elias, A.; Ferreira, A.B.M.; Bueno, C.J. Produção *in vitro* de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.4, p315-317, 2015.

Os fungos fitopatogênicos habitantes de solo causam perdas econômicas em muitas culturas e são difíceis de serem controlados. Esses fungos podem ser agrupados pelos sintomas comuns que causam nas plantas, bem como pelas enzimas extracelulares que podem produzir. O objetivo do trabalho foi verificar a produção *in vitro* de enzimas extracelulares por fungos de solo e tentar relacionar essas enzimas com os sintomas que cada fungo causa em planta hospedeira. O ensaio foi delineado em esquema inteiramente casualizado, com dois fatores, sete fungos (*Cylindrocladium spathiphylli*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Ceratocystis fimbriata*, *Sclerotinia*

*sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* e *Verticillium dahliae*) mais testemunha e seis enzimas (amilase, carboximetilcelulase, lipase, lacase, catalase e gelatinase) com 10 repetições. Catalase e gelatinase foram mensuradas por escala de notas, enquanto que as demais pelo cálculo da área da coroa circular. O ensaio foi repetido e a análise foi realizada com os dados de dois ensaios. Os fungos que causam podridão na raiz ou no colo da planta apresentaram maior produção de lacase, enquanto os que causam obstrução, fendas ou até a destruição do sistema vascular demonstraram a prevalência da lipase.

**Palavras-chave:** Fungos de solo, interação enzimas-doenças, sintomatologia.

### ABSTRACT

Elias, A.; Ferreira, A.B.M.; Bueno, C.J. *In vitro* production of extracellular enzymes by fungi and their relationship with the symptoms described for the host plant. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.4, p.315-317, 2015.

Soilborne phytopathogenic fungi cause economical losses to several crops and are difficult to control. These fungi can be grouped according to the common symptoms they cause in plants, as well as to the extracellular enzymes they can produce. The aim of this study was to verify the *in vitro* production of extracellular enzymes for soilborne fungi and to relate these enzymes to the symptoms that each fungus causes in the host plant. The assay was conducted in completely randomized design, including two factors, seven fungi (*Cylindrocladium spathiphylli*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Ceratocystis fimbriata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium*

*oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Verticillium dahliae*) plus control and six enzymes (amylase, carboxymethyl cellulase, lipase, laccase, catalase and gelatinase) with 10 replicates. Catalase and gelatinase were measured based on a score scale, while the other enzymes were analyzed by calculating the circular crown area (mm<sup>2</sup>). The assay was repeated twice and statistical analysis was done by using data of both assays. The fungi that cause root and collar rot presented greater laccase production, while those that cause obstruction, fissure and even destruction of the vascular system demonstrated prevalence of lipase.

**Additional key-words:** Soilborne fungi, enzymes-diseases interaction, symptomatology.

Os fungos fitopatogênicos habitantes de solo causam perdas econômicas em muitas culturas. Estes fungos podem produzir estruturas de resistência e estas, aliadas ao ambiente complexo do solo onde vivem, dificultam o seu controle (2). Sendo assim, novos estudos visando o seu manejo devem ser desenvolvidos.

Bedendo (1), citando McNew (1960), classificou doenças por fitopatogênicos que causam um sintoma comum em suas plantas hospedeiras, interferindo, assim, em um mesmo processo fisiológico da planta.

Pascholati (10) afirma que para um fitopatógeno infectar uma planta é preciso que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do seu hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para sua atividade

e sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta. Para isso, o patógeno utiliza-se de substâncias tais como enzimas, toxinas e hormônios.

Os objetivos do presente trabalho foram investigar a produção de enzimas extracelulares *in vitro* por diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos habitantes do solo e tentar relacionar a(s) enzima(s) com os sintomas que cada fungo causa em planta hospedeira. A associação pode facilitar futuras investigações do papel da(s) enzima(s) na patogênese do fungo.

Colônias dos fungos utilizadas nos ensaios foram produzidas no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) mais 0,05 mg/mL de oxitetraciclina, incubado em BOD a 25°C, na ausência de luz, por

oito dias.

Os meios específicos para a produção das enzimas estudadas foram preparados conforme metodologia descrita por Migotto et al. (8). Um disco do meio BDA, contendo cada espécie de fungo, foi transferido, separadamente, para o centro da placa e para tubos de ensaio. Os tubos foram utilizados para o ensaio com a enzima gelatinase e as placas para as demais enzimas.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, em esquema de dois fatores [7 fungos: *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI de crisântemo (*Dendranthema* sp.); *Sclerotium rolfsii* de ajuga (*Ajuga reptans* L.); *Ceratocystis fimbriata* de figo (*Ficus carica* L.); *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.); *Cylindrocladium spathiphylli* de espatifilo (*Spathiphyllum wallisii* Rengel); *Sclerotinia sclerotiorum* de crisântemo (*Dendranthema* sp.) e *Verticillium dahliae* de berinjela (*Solanum melongena* L.) e 6 enzimas: amilase, carboximetilcelulase, lipase, lacase, catalase e gelatinase], com 10 repetições. O tratamento controle dos testes (testemunha) constituiu-se de meios contendo discos de meio de cultura (BDA), sem que estivessem colonizados pelo isolado dos fungos. O ensaio foi repetido uma vez.

Especificamente para os fungos *R. solani*, *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, os meios permaneceram na BOD a 25 °C, no escuro, por dois dias, em função do rápido crescimento destes fungos. Os demais permaneceram por cinco dias na BOD.

A avaliação das enzimas estudadas foi feita de forma semelhante a metodologia descrita por Migotto et al. (8).

Forner et al. (5) verificaram a produção *in vitro* de enzimas extracelulares por *S. rolfsii* de *Ajuga reptans* e por *C. spathiphylli* de *Spathiphyllum wallisi* e constataram que a enzima com maior área de atividade por ambos os fungos foi a lacase. No presente trabalho (Tabela 1), constatou-se a mesma enzima com maior atividade produzida por estes fungos.

Firmino (4) caracterizou isolados de *Ceratocystis* sp. de diferentes hospedeiros quanto à produção *in vitro* de enzimas extracelulares, constatando que os isolados do fungo produziram protease, peroxidase, amilase e lacase, enquanto que a lipase, celulase e pectatolase não foram produzidas e não sendo possível afirmar a enzima prevalente. Diferentemente, neste trabalho, o isolado de *C. fimbriata* testado produziu lipase e teve a lacase como a enzima de maior produção (Tabela 01). Os principais sintomas descritos para *C. fimbriata* em planta hospedeira são podridão no colo, lenho, córtex e câmbio, e colonização do sistema vascular (7).

Os fungos que não produziram a lacase foram *S. sclerotiorum* e *V. dahliae*, enquanto *S. rolfsii* foi o maior produtor (Tabela 1).

Os fungos *S. rolfsii*, *C. spathiphylli* e *R. solani* causam em planta hospedeira principalmente podridão de raiz e colo, com sintomas reflexos de amarelecimento e murcha foliar até a morte da planta (7).

Bueno et al. (3) verificaram a produção *in vitro* de enzimas

**Tabela 1.** Produção de enzimas extracelulares *in vitro* por *Rhizoctonia solani*, *Cylindrocladium spathiphylli*, *Sclerotium rolfsii*, *Ceratocystis fimbriata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* e *Verticillium dahliae* em meios de cultura específicos mantidos em estufa tipo BOD e relação das enzimas com os principais sintomas causados pelos fungos em planta hospedeira.

Fungos	Sintomas	Amilase	Carboximetilcelulase	Lipase	Lacase	Catalase	Gelatinase
		Área da coroa circular (mm <sup>2</sup> )				Escala de notas <sup>5</sup>	
<i>Rhizoctonia solani</i>	Podridão de raiz e colo	0,0* b <sup>1</sup> C <sup>2</sup>	0,0 c C	198,7 d B	392,5 c A	2,0* b <sup>3</sup> B <sup>4</sup>	2,9 a A
<i>Cylindrocladium spathiphylli</i>		0,0 b C	0,0 c C	870,0 b B	1013,4 b A	(2,0±0,0) <sup>6</sup>	(3,0±1,0)
<i>Sclerotium rolfsii</i>		0,0 b C	0,0 c C	185,9 d B	1483,2 a A	2,0 b A	1,6 b B
<i>Ceratocystis fimbriata</i>		0,0 b C	0,0 c C	167,4 d B	1091,7 b A	(2,0±0,0)	(1,0±2,0)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Podridão de raiz e colo, fendas e até destruição do sistema vascular	0,0 b C	38,8 b B	1184,4 a A	0,0 e C	2,0 b A	1,0 b B
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	Obstrução do sistema vascular	0,0 b C	0,0 c C	1041,3 b A	54,8 d B	(2,0±0,0)	(1,0±0,0)
<i>Verticillium dahliae</i>		165,1 a B	367,2 a A	430,8 c A	0,0 e C	2,7 a A	1,3 b B
Testemunha		0,0 b A	0,0 c A	0,0 e A	0,0 e A	(3,0±1,0)	(1,0±1,0)
						2,0 b A	1,0 b B
						(2,0±0,0)	(1,0±0,0)
						1,0 c A	1,0 b A
						(1,0±0,0)	(1,0±0,0)

\*Média de dois ensaios. Cada ensaio com 10 repetições, totalizando 20 repetições por isolado e por enzima;

<sup>1</sup>Letras minúsculas iguais, na coluna, para as enzimas amilase, carboximetilcelulase, lipase e lacase não diferem entre si segundo o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ , sendo x os valores das áreas;

<sup>2</sup>Letras maiúsculas iguais, na linha, para as enzimas amilase, carboximetilcelulase, lipase e lacase não diferem entre si segundo o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade;

CV= 31,04%;

<sup>3</sup>Letras minúsculas iguais, na coluna, para as enzimas catalase e gelatinase não diferem entre si segundo o teste de Kruskal-Wallis com 1% de probabilidade;

<sup>4</sup>Letras maiúsculas iguais, na linha, para as enzimas catalase e gelatinase não diferem entre si segundo a análise de Mann-Whitney com 5% de probabilidade;

<sup>5</sup>Escala de notas, sendo 1=ausência; 2=fraca; 3=moderada e 4=intensa, sendo que para catalase refere-se ao tamanho das bolhas formadas e para a gelatinase quanto à liquefação ou não do meio;

<sup>6</sup>Mediana e semi-amplitude interquartilica.

extracelulares por isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, constatando que a enzima com maior produção foi a lipase. Semelhantemente, neste trabalho, a enzima com maior produção por *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* e *V. dahliae* foi, também, a lipase. Especificamente para *V. dahliae*, as enzimas lipase e carboximetilcelulase não apresentaram diferenças significativas entre si quanto à produção (Tabela 01).

Os fungos *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* e *V. dahliae* causam em planta hospedeira os principais sintomas de avermelhamento, escurecimento e obstrução do sistema vascular, culminando em amarelecimento e murcha foliar até a morte da planta (7).

O fungo *S. sclerotiorum* causa, inicialmente, podridão na raiz e no colo com sintomas reflexos de amarelecimento, murcha e seca da parte aérea tal como os fungos *R. solani*, *S. rolfsii*, *C. spathiphylli* e *C. fimbriata* (7). Diante disto, era de se esperar que *S. sclerotiorum* produzisse em maior quantidade a enzima lacase. Contudo, a lipase, que foi produzida por todos os fungos, foi preponderante em *S. sclerotiorum* (Tabela 01). Diferentemente dos demais fungos, *S. sclerotiorum*, após sua ação patogênica inicial na planta, ataca o sistema vascular, causando fendas e até a destruição do mesmo (7), assim como os outros fungos que comprometem o sistema vascular, como *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* e *V. dahliae*.

Quanto à enzima carboximetilcelulase, os únicos fungos que a produziram foram *S. sclerotiorum* e em destaque *V. dahliae* (Tabela 01). Segundo Hasan et al. (6), o fungo *Verticillium lecanii* produz em meios específicos as enzimas protease, amilase e lipase. No entanto, não foi possível afirmar qual enzima prevaleceu em termos quantitativos. O trabalho de Hasan et al. (6) corrobora com a produção *in vitro* das enzimas extracelulares amilase, lipase e carboximetilcelulase por *V. dahliae*. Além disto, este foi o único fungo que produziu amilase (Tabela 01). Oliveira et al. (9) constataram em meios específicos, principalmente quando suplementado com células de parede celular de feijão (*Phaseolus vulgaris*), a produção de poligalacturonase, CMCase (celulases), glucanase e xilanase por *S. sclerotiorum*. A produção de carboximetilcelulase por *S. sclerotiorum* de crisântemo (Tabela 01) é corroborada pelos dados do trabalho de Oliveira et al. (9).

Catalase e gelatinase quando produzidas foram de maneira fraca. Todos os fungos testados produziram catalase, destacando-se *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. A gelatinase apenas *R. solani* a produziu (Tabela 01).

Fazendo-se uma relação de enzimas extracelulares produzidas por fungos *versus* sintomas descritos em planta hospedeira, os fungos que causam podridão de raiz e colo (*R. solani*, *C. spathiphylli*, *S. rolfsii* e *C. fimbriata*) produziram com prevalência a lacase. Para os fungos que causam obstrução, fendas ou até a destruição do sistema vascular (*S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* e *V. dahliae*), a lipase foi a enzima prevalente. Devido à fraca produção de catalase e a quase ausência de gelatinase não foi possível relacionar essas enzimas com os sintomas que cada fungo causa em planta hospedeira (Tabela 01).

Segundo as referências de Migotto et al. (8), as lacases podem ser produzidas por fungos, plantas superiores e, também, por bactérias. Em fungos, as lacases estão envolvidas em degradação de lignina, produção de pigmento e, também, na patogênese de plantas. De acordo

com Pascholatti (10), a maioria dos fitopatógenos pode produzir uma variedade de enzimas extracelulares. No entanto, os estudos da comprovação do papel destas enzimas na infecção de plantas são escassos.

Bedendo (1), citando McNew (1860), classificou doenças analisando fungos de gêneros diferentes que causam sintomas comuns na planta hospedeira. No presente trabalho, verificou-se que fungos de gêneros diferentes e que causam sintoma comum na planta produzem também uma enzima em comum. Essa observação pode ajudar nas pesquisas futuras do papel da(s) enzima(s) produzida(s) pelo fungo na sua patogênese. Além disto, essa observação pode abrir uma nova porta para controle de doenças baseado em enzimas. Em hipótese, suprimindo a ação da enzima responsável pelo início da patogênese, supõe-se que não haverá o desenvolvimento da doença.

O próximo passo agora do trabalho é seguir os moldes do artigo de Oliveira et al. (9), que além de verificarem a produção de enzimas em condições *in vitro*, infectaram a planta hospedeira e mediram a produção das mesmas enzimas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bedendo, I.P. Classificação de doenças. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 805-907. v. 1: Princípios e Conceitos.
2. Bueno, C.J.; Ambrósio, M.M. de Q.; Souza, N.L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 47-55, 2007.
3. Bueno, C.J.; Chagas, H.A.; Bettiol, W.; Furtado, E.L. Produção de enzimas extracelulares por isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* de crisântemo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, p. 54-54, 2011. Suplemento.
4. Firmino, A.C. **Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas**. 2011. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
5. Forner, C.; Visconti, A.; Bueno, C.J.; Oliveira, F.R.A.; Bettiol, W. Produção de enzimas extracelulares por *Sclerotium rolfsii* de ajuga e por *Cylindrocladium spathiphylli* de espatifilo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu v. 37, p. 150-150, 2011. Suplemento.
6. Hasan, S.; Ahmad, A.; Purwar, A.; Khan, N.; Kundan, R.; Gupta, G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Bioinformation**, Singapore, v.9, n.5, p.238-242, 2013.
7. Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 774p. v. 2: Doenças das plantas cultivadas.
8. Migotto, B.C.; Ferreira, A.B.M.; Bueno, C.J. *Cylindrocladium spathiphylli* de espatifilo (*Spathiphyllum wallisii* Rengel): detecção de enzimas extracelulares em isolados normais e alterados por temperatura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.2, p.89-96, 2013.
9. Oliveira, M.B.; Barbosa, S.C.; Petrofeza, S. Comparative *in vitro* and *in planta* analyses of extracellular enzymes secreted by the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1796-1807, 2013.
10. Pascholatti, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 343-364. v.1: Princípios e conceitos.