

# *Cylindrocladium spathiphylli* de espatifilo: relação da patogênese com produção *in vitro* da enzima lacase

Bruna Cristina Migotto<sup>1,2</sup>; Ana Beatriz Monteiro Ferreira<sup>1,3</sup>; César Júnior Bueno<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Biológico / APTA. Alameda dos Videiros, n. 1097, Bairro Gramado, CEP 13101-680, Campinas - São Paulo - Brasil; <sup>2e3</sup>Bolsistas do PIBIC - CNPq (Processo: 137230/2011-7) e Capes, respectivamente.

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

Data de chegada: 02/12/2015. Aceito para publicação em: 08/12/2016.

10.1590/0100-5405/2144

## RESUMO

Migotto, B.C.; Ferreira, A.B.M.; Bueno, C.J. *Cylindrocladium spathiphylli* de espatifilo: relação da patogênese com produção *in vitro* da enzima lacase. *Summa Phytopathologica*, v.43, n.1, p.52-54, 2017.

O fungo *Cylindrocladium spathiphylli* causa podridão no colo e nas raízes de espatifilo. Fungos produzem enzimas extracelulares e muitas destas podem estar envolvidas na patogênese. Há poucos estudos procurando comprovar o papel de uma determinada enzima na patogênese, principalmente no patossistema *C. spathiphylli* e espatifilo. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a patogenicidade de diferentes isolados do fungo em espatifilo, em condições de BOD, e depois relacionar a patogênese com a produção *in vitro* da enzima extracelular lacase. O ensaio da patogenicidade foi inteiramente casualizado, com dois isolados normais e três isolados alterados por fungistase com seis repetições. Após a inoculação, avaliou-se a severidade da doença em mudas de espatifilo em quatro períodos (até 10 dias) com uma escala de notas (1,0 – sadia até 3,0 – morte de plantas). Aos 10 dias de avaliação, a severidade média da doença causada pelo isolado normal MMBF 01/01 e pelos isolados alterados MMBF 01/01 – 9 D e LFEEI016 – 3 D foi semelhante, enquanto que a severidade

causada pelo isolado normal LFEEI016 não diferiu da testemunha. O isolado alterado MMBF 01/01 – 3 D apresentou severidade máxima da doença (nota média 3,0) aos sete dias de avaliação, diferindo dos demais. Quanto à enzima lacase, delineou-se ensaio inteiramente casualizado, com os mesmos isolados do fungo, em placa de Petri contendo meio específico para produção da enzima lacase com seis repetições. Mensurou-se a área da coroa circular da enzima formada no meio. A maior área média da enzima foi produzida pelo isolado alterado MMBF 01/01 – 3 D (2256,0 mm<sup>2</sup>), enquanto que as áreas dos isolados alterados LFEEI016 – 3 D e MMBF 01/01 – 9 D e do isolado normal MMBF 01/01 foram iguais e a menor área de lacase foi produzida pelo isolado normal LFEEI016 (747,2 mm<sup>2</sup>). Há uma relação quanto à quantidade da enzima lacase produzida *in vitro* com a severidade da doença causada pelos isolados na planta, o que reforça a necessidade de mais estudos *in vivo* para provar o papel da lacase na patogênese do fungo *C. spathiphylli* em espatifilo.

**Palavras-chave:** Lírio da Paz, podridão de raiz e colo, agressividade, patogenicidade.

## ABSTRACT

Migotto, B.C.; Ferreira, A.B.M.; Bueno, C.J. *Cylindrocladium spathiphylli* from spathiphyllum: relationship between pathogenicity and *in vitro* production of the enzyme laccase. *Summa Phytopathologica*, v.43, n.1, p.52-54, 2017.

The fungus *Cylindrocladium spathiphylli* causes collar and root rot in spathiphyllum. Fungi produce extracellular enzymes, most of which can be involved in pathogenicity. There are few studies that aim to prove the role of a certain enzyme in pathogenicity, especially for the pathosystem *C. spathiphylli* and spathiphyllum. Thus, the aim of the present study was to verify, under BOD conditions, the pathogenicity of different fungal isolates in spathiphyllum and to relate such pathogenicity to the *in vitro* production of the extracellular enzyme laccase. The pathogenicity assay was completely randomized with two normal isolates and three isolates altered by fungistasis, in six replicates. After inoculation, disease severity in spathiphyllum seedlings was evaluated at four different periods (until 10 days), using a score scale (1.0=health to 3.0=death of seedling). At 10 days, mean disease severity caused by the normal isolate MMBF 01/01 was similar to that caused by the altered isolates MMBF 01/01 – 9 D and LFEEI016 – 3 D, while the disease severity caused by the normal isolate LFEEI016

did not differ from that of control. The altered isolate MMBF 01/01 – 3 D showed maximum disease severity (average score 3.0) at seven days of evaluation, differing from the remaining isolates. As to the enzyme laccase, a completely randomized assay was designed with the same fungal isolates on Petri plate containing specific medium for laccase production, in six replicates. The area of the circular crown formed in the medium was measured. The largest mean area of the enzyme was produced by the altered isolate MMBF 01/01 – 3 D (2256.0 mm<sup>2</sup>), while the areas produced by the altered isolates LFEEI016 – 3 D and MMBF 01/01 – 9 D were equal to that produced by the normal isolate MMBF 01/01, and the smallest area of laccase was produced by the normal isolate LFEEI016 (747.2 mm<sup>2</sup>). *In vitro* production of the enzyme laccase was related to the disease severity caused by the isolates in the plant, which reinforces the need of further *in vitro* studies to prove the role of laccase in the pathogenicity of the fungus *C. spathiphylli* in spathiphyllum.

**Keywords:** Spathiphyllum, root and collar rot, aggressiveness, pathogenicity.

*Spathiphyllum wallisii* Rengel é uma planta ornamental muito popular, nativa da América do Sul e cultivada sob sistemas intensivos em casas-de-vegetação, sendo comercializada, principalmente, em vasos. Pertence à família Araceae e é conhecida como espatifilo, bandeira branca ou lírio da paz (7; 9).

O principal fitopatógeno do espatifilo é *Cylindrocladium spathiphylli* Schoulties, El-Gholl & Alfieri (teleomorfo: *Calonectria spathiphylli* El-Gholl, Uschida, Alfenas, Schub & Alfieri), um fungo habitante de solo. Ele causa podridão no colo e nas raízes das plantas, com sintomas reflexos na parte aérea na forma de amarelecimento e murcha foliar. Com a evolução da doença, ocorre a morte da planta (5; 9).

Gowariker et al. (4) e Basseto et al. (2) comentam que o efeito fungistático inibe, temporariamente, o crescimento micelial de um fungo. Esse efeito pode ser causado por uma substância ou por um composto ou, ainda, por outros fatores como, por exemplo, a temperatura alta. Segundo Basseto et al. (2), o fungo que sofreu efeito fungistático pode apresentar alteração na sua fisiologia vegetativa, o micélio.

Segundo Bateman & Basham (3), muitos fungos produzem enzimas extracelulares de importância na degradação e no transporte de nutrientes para a célula e, também, no processo de patogênese.

Assim, a fungistase, além de alterar o micélio, pode alterar as quantidades de enzimas extracelulares produzidas e essas enzimas, por sua vez, podem influenciar no processo de patogênese. Além disto, há poucos estudos procurando estudar o papel de uma determinada enzima na patogenicidade do patossistema *C. spathiphylli* e espatifilo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade e a severidade da doença causada por isolados normais e por isolados alterados por temperatura alta (fungistase) de *C. spathiphylli*, em mudas de espatifilo, e, posteriormente, relacionar a patogênese com a produção *in vitro* da enzima extracelular lacase.

Dois isolados normais de *C. spathiphylli* foram obtidos, sendo um da micoteca da EPAGRI de Itajaí/Santa Catarina (LFEEI016) e o outro do Centro de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo (MMBF 01/01). Após alteração micelial dos isolados normais do fungo por temperatura alta (33°C), segundo referências e metodologias citadas por Migotto et al. (6), três isolados alterados foram conseguidos: 1) LFEEI016 – 3 D; 2) MMBF 01/01 – 3 D e 3) MMBF 01/01 – 9 D.

O inóculo dos isolados do fungo foi produzido em momentos diferentes no meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), mantido em estufa BOD, a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por 21 dias.

A concentração de inóculo dos isolados normais foi ajustada para  $10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, enquanto que a dos isolados alterados MMBF 01/01 – 3 D e MMBF 01/01 – 9 D para  $10^3$  conídios mL<sup>-1</sup> e o isolado LFEEI016 – 3 D não produziu conídios, ficando a suspensão de inóculo água e fragmentos de micélio. As diferenças na concentração de inóculo ocorreram devido à alteração micelial provocada pela exposição dos isolados a temperatura alta. Essa alteração micelial nos isolados pode ser verificada no estudo de Migotto et al. (6).

Mudas jovens de espatifilo, do cultivar Z23, produzidas na Holanda, foram obtidas do sítio Viva Flora, situado no município de Holambra-São Paulo. Feriu-se o colo e as raízes das mudas com auxílio de um bisturi estéril e, em seguida, este material foi colocado em contato com 30 mL da suspensão de conídios dos isolados. As mudas e as suspensões foram colocadas em beakers estéreis de 50 mL de volume. O tratamento controle (testemunha) constituiu-se de beakers contendo água destilada e as mudas com as raízes e o colo feridos.

O ensaio foi mantido dentro de condições de estufa BOD, a 23°C,

com fotoperíodo de 12 horas de luz, por até 10 dias.

O ensaio da patogenicidade foi montado em momentos diferentes, mas o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com os isolados do fungo mais testemunha e seis repetições, sendo cada parcela (repetição) representada por um becker contendo quatro mudas. Após a inoculação, avaliou-se a severidade da doença, em quatro períodos diferentes (0, 5, 7 e 10 dias), com auxílio de uma escala de notas (10), a saber: 1,0 = muda sadia; 2,0 = muda com folha baixa murcha ou amarelada, murcha da parte aérea e raiz e colo com sintoma de podridão escura e 3,0 = muda morta.

Os dados de severidade da doença de todos os isolados foram analisados conjuntamente aplicando a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis com nível de 5% de probabilidade.

Toda a metodologia de produção e avaliação *in vitro* da enzima extracelular lacase pelos mesmos isolados do fungo consta no trabalho de Migotto et al. (6).

No último dia de avaliação (10 dias), a severidade média da doença causada pelo isolado normal MMBF 01/01 (nota média 3,00) no espatifilo foi, significativamente, maior que a causada pelo isolado normal LFEEI016 (nota média 2,00). A severidade média da doença causada pelo isolado alterado MMBF 01/01 - 3 D (nota média 3,00) foi significativamente diferente dos demais isolados porque esse isolado matou todas as plantas do ensaio com sete dias de avaliação (nota média 3,00), enquanto que o isolado alterado MMBF 01/01 - 9 D causou tal efeito apenas no último dia de avaliação - 10 dias. O isolado alterado LFEEI016 - 3 D não chegou a matar todas as plantas com 10 dias de avaliação do ensaio, mas causou morte de algumas delas (nota média 2,42). O tratamento testemunha apresentou todas as plantas sadias até os 10 dias de avaliação do ensaio (nota média 1,00). A severidade média da doença causada pelo isolado normal LFEEI016 (nota média 2,00) não diferiu significativamente do tratamento testemunha (Tabela 01).

Quanto aos períodos, o melhor para avaliar a patogenicidade e a severidade da doença dos isolados foi o último, 10 dias (Tabela 01).

Aparecido et al. (1) testaram e constataram a patogenicidade do isolado MMBF 01/01 em mudas de espatifilo. O isolado inoculado nas condições do ensaio de Aparecido et al. (1) causou sintomas característicos da doença com 10 dias após a inoculação. Em mudas de espatifilo do cultivar Z23, o isolado normal MMBF 01/01 demonstrou, novamente, estar patogênico e causar sintomas característicos da doença, 10 dias após a inoculação (Tabela 01), fatos estes semelhantes ao do ensaio de Aparecido et al. (1).

Visconti et al. (10) testaram e constataram a patogenicidade do isolado LFEEI016 em mudas de espatifilo no cultivar Opal. No presente estudo, o mesmo isolado de Visconti et al. (10) foi inoculado em mudas de espatifilo no cultivar Z23 e, também, constatou-se a sua patogenicidade (Tabela 01). Nas condições do ensaio de Visconti et al. (10), os sintomas característicos da doença foram observados com 29 dias após a inoculação, enquanto que no presente estudo (Tabela 01) observaram-se os sintomas da doença com 10 dias após a inoculação.

Os sintomas da doença observados nas mudas de espatifilo no cultivar Z23, causados pelos isolados de *C. spathiphylli* utilizados, foram semelhantes aos descritos e observados por Aparecido et al. (1), Visconti et al. (10), Grijalba & Palmucci (5) e Reis et al. (9).

Apesar de alguns isolados alterados terem sido inoculados em espatifilo com concentração de inóculo menor do que os isolados normais, eles causaram maior severidade da doença. Diante disto e em hipótese, houve alguma mudança fisiológica nos isolados alterados e isto implicou em maior agressividade destes isolados na planta.

Pascholati (8) relata que para um fitopatógeno infectar uma planta

**Tabela 1.** Severidade da doença causada por isolados de *Cylindrocladium spathiphylli* e por isolados deste fungo alterados por temperatura alta (33°C) em mudas de espatifilo cultivar Z23 e a produção *in vitro* da enzima extracelular lacase pelos mesmos isolados do fungo, em meio de cultura específico mantido em estufa tipo BOD.

Tratamentos	Severidade da doença (Escala de notas**) avaliada em diferentes períodos (dias)				Enzima extracelular lacase Área da coroa circular (mm <sup>2</sup> )
	0	5	7	10 dias	
LFEEI016 - normal	1,00* a <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	1,87 ab AB	2,00 ab B	2,00 a B	747,2* c <sup>3</sup>
MMBF 01/01 - normal	1,00 a A	2,18 b AB	2,18 abc AB	3,00 b B	1808,8 b
LFEEI016 – 3 D alterado	1,00 a A	2,00 b AB	2,04 ab B	2,42 ab B	1817,1 b
MMBF 01/01 – 3 D alterado	1,00 a A	2,25 b AB	3,00 c B		2256,0 a
MMBF 01/01 – 9 D alterado	1,00 a A	2,00 b AB	2,50 bc BC	3,00 b C	1735,8 b
Testemunha	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A	0,0 d

\*Média de seis repetições; <sup>1</sup>Letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem entre si com nível de 5% de probabilidade, segundo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; <sup>2</sup>Letras maiúsculas iguais, na linha, não diferem entre si com nível de 5% de probabilidade, segundo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; <sup>3</sup>Letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem entre si segundo o teste paramétrico de Scott-Knott com nível de 1% de probabilidade. Para efeito de análise estatística, os dados das áreas da enzima lacase foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ , sendo x os valores das áreas. CV = 4,3%.

\*\*Escala de notas (10): 1= muda sadia; 2= muda com folha baixeira murcha ou amarelada, parte aérea murcha e colo e raiz com sintoma de podridão escura e 3= muda morta.

(patogênese) 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. Segundo Bateman & Basham (3), muitos fungos produzem enzimas extracelulares de importância na degradação e no transporte de nutrientes para a célula e, também, no processo de patogênese. De acordo com Basseto et al. (2), o fungo que sofreu efeito fungistático pode apresentar alteração na sua fisiologia vegetativa, o micélio. Assim e em hipótese, a fungistase pode alterar o micélio, incluindo as quantidades de enzimas extracelulares produzidas. Essas enzimas, por sua vez, podem influenciar no processo de patogênese.

Enfocando a questão da enzima extracelular lacase (Tabela 01), segundo dados do trabalho de Migotto et al. (6) verifica-se que a maior área média desta enzima foi produzida pelo isolado alterado MMBF 01/01 – 3 D (2256,0 mm<sup>2</sup>), enquanto que as áreas dos isolados alterados LFEEI016 – 3 D e MMBF 01/01 – 9 D e do isolado normal MMBF 01/01 foram iguais e a menor área da lacase foi produzida pelo isolado normal LFEEI016 (747,2 mm<sup>2</sup>).

Quando há maior quantidade de produção da enzima lacase pelo isolado do fungo isto reflete em maior severidade da doença, é o que pode ser observado, por exemplo, no isolado alterado MMBF 01/01 – 3 D, ou seja, este isolado foi o maior produtor *in vitro* da enzima lacase e, consequentemente, foi o único que matou precocemente todas as plantas de espatifilo com sete dias de avaliação (Tabela 01). Portanto e em hipótese, há uma forte evidência do papel da enzima lacase na patogênese deste fungo em plantas de espatifilo. Para validar essa hipótese há a necessidade de mais estudos, principalmente *in vivo*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Christiane C. Aparecido, do Instituto Biológico/SP, e ao Dr. Alexandre Visconti, da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI/ SC), pela disponibilização de isolados do fungo para a realização deste estudo.

Agradecemos também os irmãos Ronaldo A. Kievitsbosch e Maurício Kievitsbosch, da empresa Viva Flora®, que forneceram, gratuitamente, as mudas sadias de espatifilo para a realização dos ensaios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aparecido, C. C.; Furtado, E. L.; Figueiredo, M. B. Caracterização morfo-fisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 38-47, 2008.
- Basseto, M. A.; Bueno, C. J.; Chagas, H. A.; Rosa, D. D.; Padovani, C. R.; Furtado, E. L. Efeitos da simulação da solarização do solo com materiais vegetais sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 116-120, 2011.
- Bateman, D. F.; Bashan, H. G. Degradation of plant-cell walls and membranes by microbial enzymes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.4, p.316-355, 1976.
- Gowariker, V.; Krishnamurthy, V. N.; Gowariker, S.; Dhanorkar, M.; Paranjape, K. **The Fertilizer Encyclopedia**. New York: John Wiley & Sons, 2009. 872 p.
- Grijalba, P. E.; Palmucci, H. E. *Cylindrocladium spathiphylli*, a causal agent of root and crown rot of *Spathiphyllum wallisii* in Buenos Aires, Argentina. **Phyton**, Buenos Aires, v. 76, p. 79-84, 2007.
- 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.
- Parodi, L. R.; Dimitri, M. J. **Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería**. Buenos Aires: Ed. ACME. 1978. 1161 p.
- Pascholati, S. F. **Fitopatógenos: arsenal enzimático**. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). Manual de fitopatologia. 3.ed. São Paulo. Agronômica Ceres, pp. 343-364. v.1: Princípios e conceitos. 1995.
- Reis, A.; Mafía, R. G.; Silva, P. P.; Lopes, C. A.; Alfenas, A. C. *Cylindrocladium spathiphylli*, causal agent of *Spathiphyllum* root and collar rot in the Federal District – Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 102, 2004.
- Visconti, A.; Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. Efeito de hidrolisado de peixe sobre o crescimento micelial e controle de *Cylindrocladium spathiphylli* em espatifilo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.4, p.298-308, 2010.