

Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp.

Ana Carolina Firmino¹, Edson Luiz Furtado¹.

¹Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária, UNESP/FCA, CEP 18610-307, Botucatu, SP, Brasil.

*Autor para correspondência: Edson Luis Furtado (elfurtado@fca.unesp.br).

Data de chegada: 13/03/2014. Aceito para publicação em: 29/09/2014.

10.1590/0100-5405/1986

RESUMO

Firmino, A.C. Furtado, E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.4, p.371-374, 2014.

O gênero *Ceratocystis* contempla diversas espécies distribuídas em vários lugares do mundo. No Brasil ocorrem relatos da existência de três espécies, sendo elas: *C. cacaofunesta*, *C. paradoxa* e *C. fimbriata*, sendo esta última relacionada a doença em culturas de importância econômica. O trabalho objetivou verificar, em meios de cultura específicos, a produção das enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, protease, lacase e lignina peroxidase e pectiliase (pectato-liase) por isolados de *Ceratocystis* sp. Foram usados 41 isolados: 3 de mangueira (*Mangifera indica*), 19 de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), 15 de cacaueteiro (*Theobroma cacao*), 2 de Teca (*Tectona grandis*) e 2 de atemóia

(*Annona* sp.). As colônias foram incubadas no escuro a 25°C, com exceção do meio para detecção de pectinase que foi incubado sob fotoperíodo alternado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. A partir dos meios específicos foi possível detectar a produção de amilase, lacase e protease quase na totalidade dos isolados *Ceratocystis* sp. testados. Não foi observada a produção de celulase, lipase e pectatoliase. A produção da enzima lignina peroxidase foi detectada em pouca quantidade e em somente alguns isolados do fungo. Este perfil enzimático obtido da população do fungo pode auxiliar em futuros estudos relacionados com a caracterização deste.

Palavras-chave adicionais: caracterização, enzimas, fungo

ABSTRACT

Firmino, A.C. Furtado, E.L. Extracellular enzyme production by *Ceratocystis* spp. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.4, p.371-374, 2014.

The genus *Ceratocystis* includes several species distributed over several parts of the world. In Brazil there are reports of the existence of three species: *C. cacaofunesta*, *C. paradoxa* and *C. fimbriata*, the latter being related to disease in crops of economic importance. This study aimed to determine, in specific culture media, the production of the extracellular enzymes amylase, lipase, cellulase, protease, laccase, lignin peroxidase and pectilyase (pectatelyase) for isolates of *Ceratocystis* spp. A total of 41 isolates were used: 3 from mango (*Mangifera indica*), 19 from eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), 15 from cocoa (*Theobroma cacao*), 2 from Teak (*Tectona grandis*) and 2 from atemoya (*Annona* sp.). The

colonies were incubated in the dark at 25°C, except for the medium for pectinase detection which was incubated under alternating photoperiod. Experimental design was completely randomized with 4 replicates. The specific media allowed the detection of the production of amylase, laccase and protease for almost all tested isolates of *Ceratocystis* sp. Production of cellulase, lipase and pectatelyase was not observed. Production of the enzyme lignin peroxidase was detected in small amounts and in only a few isolates of the fungus. This enzymatic profile obtained from the fungus population may assist in future studies related to its characterization.

Additional keywords: characterization, enzymes, fungi

O gênero *Ceratocystis* contempla diversas espécies fungicas distribuídas em vários lugares do mundo. No Brasil há relatos de *C. cacaofunesta*, ocorrendo em cacaueteiro, *C. paradoxa*, ocorrendo, principalmente, em cana de açúcar e palmeiras e o mais importante *C. fimbriata*, que ataca diversas espécies de plantas como acácia negra (*Acacia mearnsii*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), figo (*Ficus carica*), gmelina (*Gmelina arborea*), manga (*Mangifera indica*) e seringueira (*Hevea brasiliensis*).

Em plantas lenhosas, o fungo *Ceratocystis* é um típico patógeno de xilema (1), cujo sintoma característico é o escurecimento dos vasos do xilema. Normalmente uma planta infectada com este patógeno tem como primeiros sintomas a perda de coloração verde-escura da folhagem, seguida de murcha das folhas e conseqüentemente seca da planta.

Espécies de *Ceratocystis* estão fortemente associadas com insetos apesar de ainda não se conhecer os vetores específicos de *C. fimbriata* na América Latina. Árvores infectadas com o fungo *Ceratocystis* são

frequentemente atacadas por scolytídeos (Coleoptera: *Curculionidae*: *Scolytinae* e *Platypodinae*).

No Brasil até meados de 1990, *C. fimbriata* era considerado problema somente em plantações de mangueira. Em cacaueteiro, a murcha-de-*Ceratocystis* tem causado danos econômicos na cacauicultura do Brasil desde 2001 e em países vizinhos (7). Em plantas de eucalipto há relatos de talhões monoclonais que apresentavam mortalidade de plantas superior a 40%.

Para o estabelecimento de um fungo em uma planta e o desenvolvimento da doença há a ocorrência de uma série de etapas de reconhecimento entre o patógeno e planta. Durante este reconhecimento, algumas exigências devem ser atendidas. Essas exigências implicam na ativação de várias vias metabólicas tanto do lado do patógeno quanto do lado do hospedeiro. As vias metabólicas envolvidas nestes processos estão ligadas a troca de sinais entre patógenos e hospedeiro. Estes sinais podem ser de natureza química ou física. Os sinais de natureza química por parte do patógeno envolvem as atividades de enzimas que podem

exercerem diferentes funções, como por exemplo degradação da parede de células do hospedeiro, facilitando a penetração do fungo na planta (6) Entre os microrganismos fitopatogênicos, muitos produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanasas, exercem um importante papel na patogênese (10).

Diante do problema que o *Ceratocystis* vem causando em diferentes culturas e da importância que este patógeno vem tomando, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar aspectos enzimáticos deste fungo coletados de diferentes hospedeiros.

Para este estudo foram utilizados 41 isolados: 3 de mangueira (*Mangifera indica*), 19 de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), 15 de cacau (*Theobroma cacao*), 2 de Teca (*Tectona grandis*) e 2 de atemóia (*Annona* sp.). Discos com 5 mm de diâmetro de meio MEA (2% de Malte, 0,2% de Extrato de levedura e 1% de Agar) contendo estruturas do fungo foram retirados do bordo de colônias cultivadas por 14 dias no escuro sob temperatura de 25°C±1 e repicados individualmente para o centro de placas de Petri, contendo os meios específicos para detecção das enzimas. Os protocolos para detecção das atividades da pectinase, proteinase e lipase estão de acordo com a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (4), os protocolos para atividades da lacase, lignina peroxidase, amilase e celulase foram realizados com como descrito por Firmino (2). Com exceção da enzima lacase, que foi avaliada através da atribuição de notas, todas as outras enzimas foram avaliadas através do cálculo de índice enzimático (diâmetro da colônia (mm) / diâmetro do halo formado (mm)).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância 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, através do programa Sisvar.

A partir dos meios específicos, foi possível detectar a produção de protease, lignina peroxidase, lacase e amilase quase na totalidade dos isolados de *Ceratocystis* spp. testados (Tabela 1). Foi detectada grande variação na produção das enzimas protease e lignina peroxidase nos isolados testados, sendo esta última comum em fungos que degradam madeira. As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção.

A maioria dos isolados que mostrou produção intensa da enzima lacase pertence aos isolados de *Ceratocystis* coletadas de cacau (*C. cacaofunesta*). Esta diferença na produção desta enzima pode auxiliar em futuros estudos relacionados com a caracterização deste fungo, vindo a ser uma ferramenta rápida para distinguir espécies de *Ceratocystis* de cacau de outras espécies deste fungo. Ademais, a constatação da produção de lignina peroxidase e lacase por *Ceratocystis* vem a ser muito importante, pois estas duas enzimas são as principais enzimas envolvidas na degradação da lignina (5). Estas enzimas são descritas como importantes para os microrganismos fitopatogênicos, pois é através destas que eles se tornam capazes de superar a resistência natural dos componentes da madeira, em especial a lignina, que é constituída por uma estrutura aromática complexa (3). A lacase vem ganhando importância devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, sendo utilizadas em diversos processos, como remoção de lignina de polpas kraft em indústrias de papel e celulose, remoção de xenobióticos de cursos d'água, análise de drogas, remoção de compostos fenólicos de vinho, clarificação de corantes e efluentes, entre muitos outros, por apresentarem baixa especificidade por substratos.

Para a enzima amilase, não foi constatada variação significativa entre os isolados testados, exceto pelo isolado AFC07 que não produziu esta enzima. Alguns autores citam a presença de aglomerados de amido em plantas infectadas com *Ceratocystis* (9, 8), podendo, assim, a amilase do fungo também estar relacionada à patogenicidade.

Não foram observadas as produções de celulase, lipase e pectatoliase. A ausência da produção de pectato-liase não era esperada, pois, segundo a literatura, *Ceratocystis* spp. pode induzir tiloses em plantas hospedeiras (8), sendo que a formação destas tiloses é favorecida pela degradação da lamela média por meio de pectinases produzidas pelo patógeno (6). Assim pode haver duas hipóteses, a de que o protocolo utilizado não foi sensível o suficiente para detectar a produção desta enzima, ou que o fungo produz pectinase somente em contato com seu hospedeiro.

Contudo, com base nos dados obtidos, é possível concluir que houve produção de amilase, lacase e protease quase na totalidade dos isolados *Ceratocystis* sp. testados, mas que estes mesmos isolados não produziram celulase, lipase e pectatoliase e que a enzima lignina peroxidase foi detectada em pouca quantidade e em somente alguns isolados do fungo.

Tabela 1. Produção de enzimas extracelulares por isolados de *Ceratocystis*, em meios de cultura específicos.

Isolados/Hospedeiro		Enzimas Extracelulares ³						
		Protease ¹	Lig. Peroxidase ¹	Amilase ¹	Lacase ²	Lipase ¹	Celulase ¹	Pectatoliase ¹
ACF1	Manga	0,82c	0a	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF2	Manga	0,87c	0,88d	0,98a	+	0,00	0,00	0,00
ACF3	Manga	0,86c	0,93e	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF4	Manga	0,84c	0,95e	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF5	Cacau	0,69b	0,81c	0,98 a	+	0,00	0,00	0,00
ACF6	Cacau	0,83c	0,72b	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF7	Cacau	0,87c	0,00a	0,00b	+++	0,00	0,00	0,00
ACF8	Cacau	0,78b	0,83d	0,94 a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF9	Cacau	0,98d	0,84d	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF10	Cacau	0,75b	0,78c	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF11	Cacau	0,75b	0,69b	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF12	Cacau	0,75b	0,66b	0,94 a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF13	Cacau	0,76b	0a	0,98 a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF14	Cacau	0a	0,78c	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00

continua...

Tabela 1. Produção de enzimas extracelulares por isolados de *Ceratocystis*, em meios de cultura específicos.

Continuação

ACF15	Cacau	0,80c	0,77c	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF16	Cacau	0,76b	0,79c	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF17	Cacau	0,91d	0,90e	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF18	Cacau	0,83c	0,78c	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF19	Cacau	0,78b	0,83d	0,94a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF20	Cacau	0,70b	0,83d	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF21	Cacau	0,71b	0,83d	0,98a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF22	Cacau	0,90d	0,85d	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF23	Atemóia	1,00d	0,85d	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF24	Atemóia	0,82c	0,91e	0,93a	+	0,00	0,00	0,00
ACF25	Eucalipto	0,83c	0,80c	0,95a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF26	Eucalipto	1,00d	0,85d	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF27	Eucalipto	0a	0,85d	0,91a	++	0,00	0,00	0,00
ACF28	Eucalipto	0,71b	0,90e	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF29	Eucalipto	0,80b	0,95e	0,98a	++	0,00	0,00	0,00
ACF30	Eucalipto	0,84c	0,95e	0,95a	++	0,00	0,00	0,00
ACF31	Eucalipto	0,88c	0,94e	0,95a	++	0,00	0,00	0,00
ACF32	Eucalipto	0,82c	0a	0,96a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF33	Eucalipto	0,85c	0,79c	0,95a	++	0,00	0,00	0,00
ACF34	Eucalipto	0,84c	0,77c	0,95a	++	0,00	0,00	0,00
ACF35	Eucalipto	0,88c	0,77c	0,96a	++	0,00	0,00	0,00
ACF36	Eucalipto	0a	0,79c	0,94a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF37	Eucalipto	0,99d	0,83d	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF38	Eucalipto	0,78b	0,83d	1,00a	+	0,00	0,00	0,00
ACF39	Eucalipto	1,00d	0,77c	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF40	Eucalipto	0,79b	0,86d	0,90a	+	0,00	0,00	0,00
ACF41	Eucalipto	0,80b	0,83d	1,00a	+	0,00	0,00	0,00
ACF42	Eucalipto	0,78b	0,82d	1,00a	+	0,00	0,00	0,00
ACF43	Eucalipto	0,79b	0,83d	1,00a	+	0,00	0,00	0,00
ACF44	Eucalipto	0,81c	0a	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF45	Eucalipto	0,76b	0,86d	0,96a	+	0,00	0,00	0,00
ACF46	Eucalipto	1,07d	0a	0,95a	++	0,00	0,00	0,00
ACF47	Eucalipto	1,00d	0a	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF48	Eucalipto	0,80c	0a	0,96a	++	0,00	0,00	0,00
ACF49	Eucalipto	0,82b	0,87d	0,96a	++	0,00	0,00	0,00
ACF50	Teca	1,00d	0,85d	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF51	Teca	1,00d	0,80c	0,98a	++	0,00	0,00	0,00
ACF52	Eucalipto	0,96d	1,00f	0,98a	+	0,00	0,00	0,00
ACF53	Eucalipto	0a	0,92e	1,00a	++	0,00	0,00	0,00
ACF54	Eucalipto	0a	0,98f	1,00a	+++	0,00	0,00	0,00
ACF55	Eucalipto	0,75b	0,86d	0,91a	++	0,00	0,00	0,00

1: Resultados obtidos a partir do cálculo do Índice enzimático (diâmetro da colônia (mm) / diâmetro do halo formado (mm)). Os isolados com maior índice são os que possuem menor atividade enzimática; 2: +++ (intensa); ++ (moderada); + (fraca) e - (ausência de alteração de cor no meio de cultura); 3: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, segundo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP (2011/05710-0) e ao CNPq pelo apoio financeiro. A Dra. Stela Dalva Vieira Midlej Silva e a Dra. Margarida Fumiko Ito. Ao IAC, CEPLAC e as empresas Suzano Papel e Velulose, V&M e Fibria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, C. J.; Harrington, T. C. *Ceratocystis fimbriata*. In: Crop protection compendium. Kew: CABI Publishing, 2004.
- Firmino, A. C. **Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas**. 2011. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- Giese, E.G.; Covizzi, L.G.; Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 26, p. 463-470, 2004.
- Hankin, L.; Anagnostakis, S. L. The use of solid média for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 67, p. 597-607, 1975.
- Leonowicz, A.; Cho, N.S.; Luterek, J.; Wilkolazka, A.; Wojtas-Wasilewska M.; Matuszewska, A.; Hofrichter, M.; Wesenberg, D.; Rogalski, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**, Berlin, v. 41, p. 185- 227, 2001.
- Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: Fealq, 2008. v. 1, 627 p.
- Sanchez, C. L. G. **Murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis cacaofunesta*) no sul da Bahia: metodologia para seleção de genótipos de cacauero resistentes e estudos preliminares descritivos do patógeno**. 2007. 55 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.
- Santos, R.M.F.; Silva, S. D. V. M.; Sena, K.; Micheli, F.; Gramacho, K. P. Kinetics and Histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta*

- Interaction. **Tropical Plant Biology**, v.6, p. 37-45, 2013.
9. Tumura, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica, distribuição espacial e caracterização anatômica da madeira de clones de Eucalyptus sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata* Ellis. Et Halsted.** 2011. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-
-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
10. Valueva, T. A.; Mosolov, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, New York, v. 69, n. 1, p. 1305-1309, 2004.