

Respostas enzimáticas de defesa à murcha bacteriana.

Demosthenes L.C.R.¹, Bentes J.L.S.²

¹.Universidade Federal do Amazonas, UFAM
E-mail: liacristine@ufam.edu.br, jlbentes@ufam.edu.br.

Resumo

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é a principal doença bacteriana de Solanáceas no Amazonas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de enzimas relacionadas com respostas de defesa em acessos de *Capsicum* spp. previamente avaliados como fontes de resistência à doença. Foi avaliada a atividade de polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia liase (FAL) em 12 acessos de *Capsicum* sp. nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. A atividade enzimática variou conforme o nível de resistência dos acessos avaliados e foi maior nas primeiras horas após a inoculação decrescendo após 72 horas. A resistência dos acessos foi associada com a maior atividade da PPO e FAL, sendo o acesso LA 01 o que apresentou a maior atividade destas enzimas dentre os acessos avaliados, indicando que estas enzimas compõem o mecanismo de defesa bioquímico em plantas de *Capsicum*.

Palavras-chave: murcha bacteriana, atividade enzimática, resistência.

Introdução

A murcha bacteriana causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* é uma doença que ataca muitas espécies de plantas, dentre elas as solanáceas compreendem uma importante cultura agrícola muito suscetível, representando um problema para os produtores (Lopes e Boiteux, 2004). Na Região Norte as condições favoráveis de elevada temperatura e umidade, contribuem para a ocorrência da doença que pode se espalhar rapidamente e comprometer a produção em larga escala. A utilização de áreas contaminadas com o patógeno, práticas culturais errôneas como a rotação com espécies hospedeiras do patógeno, manejo incorreto da irrigação, ausência de uma cultivar resistente e a variabilidade do patógeno dificultam a implementação de medidas que sejam eficientes no controle da doença.

A interação entre patógeno e hospedeiro induz algumas mudanças no metabolismo das células e dependendo do patógeno, rotas de sinalização específicas das plantas são ativadas e levam à expressão de respostas de defesa como a resposta hipersensitiva (HR), produção de espécies reativas de oxigênio, acúmulo de fitoalexinas, a síntese de proteínas PR, atividades das enzimas, tais como fenilalanina amônia liase (FAL), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO), lipoxigenase (LOX) entre outras (Silva *et al.*, 2010).

O aumento da atividade de enzimas como a POX, PPO e FAL relacionadas com fontes de resistência já foi demonstrada em vários patossistemas. Araújo e Stadinik (2011) avaliando a atividade de enzimas em plântulas de macieira resistente e suscetível a mancha foliar causada por *Colletotrichum gloesporioides* observaram o aumento da atividade da POX associado à resposta da cultivar resistente. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade enzimática de PPO, FAL e POX como resposta dos componentes de defesa em acessos de *Capsicum* com diferentes níveis de resistência.

Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação em Manaus. Os acessos foram semeados em mistura de terriço e substrato comercial Bioplant® na proporção de 3:1. Para a inoculação foi utilizado o isolado IRAND10 considerado o mais agressivo em ensaio preliminar de agressividade. A inoculação foi realizada aos 30 dias de idade após o ferimento das raízes, através da introdução de um bisturi próximo ao colo da planta e vertendo-se 10 mL da suspensão de inóculo por planta. As avaliações foram feitas aos quatro, oito, 12, 16, 20 e 24 dias após a inoculação (DAI) em função da incidência e do desenvolvimento de sintomas da doença. A avaliação dos sintomas foi visual através de uma escala de notas variando de 0 a 5 (Winstead e Kelman, 1952). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. O controle consistiu de dez plantas inoculadas com água destilada esterilizada. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SAEG versão 9.0.

Para a atividade enzimática relacionada à defesa foram coletadas três folhas por planta aos 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação, então embaladas em papel alumínio, identificadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório para pesar e serem armazenadas à - 20 °C para os ensaios posteriores. Para a

determinação do teor de proteínas totais e atividade das enzimas PPO, FAL e POX, amostras de 0,1 g de tecido foliar foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino que foi homogeneizado em tampão acetato de sódio, coletado em microtubos e centrifugados a 20.000G durante 30 minutos a 4 °C em centrífuga. O sobrenadante foi recolhido em novos microtubos e estocado a - 20 °C para as determinações enzimáticas. O teor de proteínas foi quantificadas segundo Bradford (1976), a atividade de FAL foi determinada segundo Umesha (2006), a atividade da PPO e POX conforme Kar e Mishra (1976).

Resultados e Discussão

Considerando o progresso da murcha bacteriana de acordo com os valores área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) os acessos AC NT e BC 05 foram considerados resistentes apresentando menores valores, os acessos LA 01 e BC 01 moderadamente suscetíveis, os demais acessos foram considerados suscetíveis e os acessos BC 06 e LA 02, com maiores valores de AACPD foram considerados altamente suscetíveis.

A atividade de proteínas apresentou aumento inicial seguido pelo declínio alguns dias após a inoculação (d.a.i). Nos cinco dias de coleta de amostras, somente os acessos mais suscetíveis, como CD, BC 06 e LA 02 já apresentavam sintomas visíveis. Mesmo não sendo detectadas diferenças nos sintomas entre os acessos, um aumento gradual no teor de proteínas totais foi detectado a partir do 2º d.a.i..

Também foi verificada a mudança no padrão de atividade das enzimas FAL e PPO, atividade da PPO foi significativamente maior nas plantas inoculadas do que no tratamento controle, até o segundo d.a.i, quando atingiu seu máxima atividade. A atividade da enzima FAL apresentou comportamento semelhante aumentando sua atividade logo após a inoculação com o patógeno, alcançando o máximo no segundo d.a.i. e reduzindo nos dias seguintes. A atividade de FAL foi 47% maior no acesso LA 01 quando comparada com o acesso suscetível BC 12. Houve diferença quanto na dinâmica da POX durante o período de coleta para os acessos mais resistentes quando comparado ao acesso suscetível e ao tratamento controle. Enquanto no acesso com maior nível de resistência (LA 01) a atividade da POX apresenta um aumento mais rápido, no acesso susceptível (CD) esta mobilização é mais lenta. No tratamento

controle o aumento embora gradual apresenta-se num ritmo bem mais lento. As enzimas fenilalanina amônia liase (FAL), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase apresentaram maior atividade no acesso moderadamente resistente LA 01.

A diferença quanto à resposta de resistência apresentada por diferentes estirpes de *R.solanacearum* em *Capsicum* também já foi identificada por Lopes & Boiteux (2004) em estudo em Brasília, DF, onde avaliaram 23 acessos de *Capsicum* de vários países considerados como resistentes à murcha bacteriana, e por Demosthenes e Bentes (2011) também encontraram variados níveis de resistência entre acessos de *Capsicum* inoculados com um isolado da biovar 1 e conseguiram identificar três acessos resistentes (20, 30 e 17). Fatores ambientais como aumento na temperatura ambiente, tipo de solo, manejo da irrigação também são fatores que podem contribuir para manifestação da resistência diferenciada.

Em relação à atividade enzimática associada a respostas de defesa o resultado está de acordo com os obtidos por Araujo e Stadnik (2011) que também detectaram aumento no teor de proteínas totais em plântulas de macieira resistentes e suscetíveis inoculadas com *Colletotrichum gloesporioides* nas primeiras horas após a inoculação com o patógeno, indicando como a planta lança mão de suas reservas enzimáticas na tentativa de controlar a invasão do patógeno.

As enzimas FAL e PPO podem estar atuando na defesa das pimenteiros quando infectado por *R.solanacearum*, uma vez que dinâmica de aumento de atividade da FAL e PPO logo nos primeiro e segundo dia após a inoculação sugere que a planta esteja mobilizando suas respostas de defesa para conter a invasão e concorda com estudo de Ngadze *et al.* (2011) que ao estudarem o papel de diversas enzimas na resistência de tubérculos de batata contra *Pectobacterium atropsepticum* também identificaram o aumento dessas duas enzimas.

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os de Vanitha *et al.* (2009) que avaliaram o papel das enzimas PAL e PFO em tomateiro resistente e suscetível e conseguiram identificar que a maior atividade destas enzimas, nas cultivares resistentes, ocorreu as 12 e 15 horas após a inoculação com *R. Solanacearum* enquanto nas cultivares suscetíveis a atividade ocorreu mais tardiamente, indicando que estas duas enzimas tem papel importante na defesa do tomateiro à murcha bacteriana.

A resistência também pode ser mediada pelo peróxido de hidrogênio, que é frequentemente associada com a atividade de peroxidases (POX). Houve diferença quanto na dinâmica da POX durante o período de coleta para os acessos mais resistentes quando comparado ao acesso suscetível e ao tratamento controle. Enquanto no acesso com maior nível de resistência (LA 01) a atividade da POX apresenta um aumento mais rápido, no acesso susceptível (CD) esta mobilização é mais lenta. No tratamento controle o aumento embora gradual apresenta-se num ritmo bem mais lento. Esta dinâmica pode ser entendida como a capacidade em mobilizar mais rapidamente seus mecanismos de defesa bioquímicos na tentativa da planta barrar a colonização por *R.solanacearum*. Neste estudo a atividade de POX foi menor quando comparada a atividade da PAL, mas mesmo assim ela pode estar associada a outros mecanismos de resistência atuando em acessos de *Capsicum*. Andrade *et al.*, (2013) que também avaliou a atividade de POX, PFO, GLU e LOX em resposta ao ataque de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivares de tomateiro pulverizadas com ácido jasmônico, etefon e Bion e constataram dinâmica semelhante, onde puderam correlacionar o aumento na atividade das enzimas POX, PFO e LOX com a maior resistência apresentada pelo tomateiro. Neste estudo a atividades dessas enzimas foi maior entre o sexto e nono dias após a inoculação.

Conclusão

O aumento da atividade das enzimas FAL e PPO durante a infecção por *R. solanacearum* nos acessos avaliados indica que estas duas enzimas atuam nos componentes de defesa bioquímicos em *Capsicum*.

Referências

Andrade CCL, Resende RS, Rodrigues FA, Silveira PR, Rios JA, Oliveira J R, Mariano RLR (2013) Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa, *Tropical Plant Pathology* 38: 28-34.

Araújo L, Stadinik M (2011) Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloesporioides*. *Tropical Plant Pathology* 36: 241-248.

Bradford MMA (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Demosthenes LCR, Bentes JLS (2011) Fontes de resistência à murcha bacteriana em germoplasma de *Capsicum* spp. *Acta Amazonica* 41: 251-256.

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence, *Plant Physiology* 57: 315-319.

Lopes CA, Boiteux LS (2004) Biovar-specific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*, *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4: 350-355.

Ngadze E, Icishahayo D, Coutinho DD, Van der Waals JE (2011) The role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and total soluble phenols in the resistance of potatoes to soft rot, *Plant disease* 96: 186-189.

Silva FAC, Santos RC, Azevedo Neto A, Granja MMC, Souza CCF, Melo Filho PA (2010) Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em resposta a inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Tropical Plant Pathology* 35: 114-118.

Umesha, S. (2006) Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica* 34: 68-71.

Vanitha SC, Niranjana SR, Umesha S (2009) Role of Phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* 157: 552-557.

Winstead NN, Kelman A (1952) Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42: 628-634.