

Maio e Junho de 1990

VOL. XXXVII

Nº211

Viçosa — Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**SENSIBILIDADE DE FITOBACTÉRIAS ÀS SUBSTÂNCIAS COM
PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS PRESENTES EM
EXTRATOS DE FOLHAS DE FUMO INOCULADAS
DO PATÓGENO INCOMPATÍVEL *Pseudomonas*
syringae pv. *psii*^{1/}**

Talmir Duarte da Silva^{2/}
Reginaldo da Silva Romeiro^{3/}

1. INTRODUÇÃO

As fitoalexinas podem ser conceituadas como substâncias com propriedades antimicrobianas produzidas pela planta em resposta a um estímulo (3). Esse estímulo pode ser de natureza abiótica, como alguns produtos químicos (19), fungicidas (25), metais pesados (3) e condições ambientais específicas (5) etc., ou abiótica, como a inoculação de fitopatógenos. Nesse ponto de vista, a maioria dos pesquisadores concorda em que a produção de fitoalexinas pela planta é muito mais pronunciada no caso das associações incompatíveis patógeno-planta (3, 7, 12, 17, 22, 31).

Por associação incompatível patógeno-planta entendem-se as associações fitopatógeno/planta não-hospedeira (19) e fitopatógeno/planta resistente ou imune (18, 26). Em muitos casos, o estabelecimento da associação incompatível resulta numa resposta hipersensível da planta inoculada (20, 21), quase invariavelmente acompanhada de produção pronunciada de fitoalexinas (2, 3, 10, 11, 12, 24, 31, 32, 33).

Embora as fitoalexinas sejam consideradas substâncias antimicrobianas de largo espectro (3, 6, 12, 13, 23, 33, 37), patógenos compatíveis parecem ser mais insensíveis

^{1/} Aceito para publicação em 10.1.89.

^{2/} Centro de Ciências Agrárias da UFSC. 88000 Florianópolis, SC.

^{3/} Departamento de Fitopatologia da UFV. 36570 Viçosa, MG.

meio de cultura para bactérias (27). Após a solidificação do meio, foi preparada uma sobrecamada do mesmo meio (mas semi-sólida, 0,75% de ágar), ao qual, enquanto fundente, foram incorporadas células do microrganismo-teste. A fitobactéria foi cultivada em meio líquido, a 28°C/24 h. Uma alíquota de 1 ml da cultura em meio líquido foi misturada com 4 ml do meio semi-sólido fundente, e a mistura foi usada no preparo da sobrecamada. Após a solidificação da sobrecamada, discos esterilizados de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos em 20 µl do extrato e, após a evaporação do solvente, depositados na superfície da sobrecamada. Discos embebidos em 20 µl de acetato de etila puro foram usados como controle. Vinte e quatro horas após a incubação das placas, a 28°C, procedeu-se à verificação da ocorrência de halos de inibição e à medição dos respectivos diâmetros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios acham-se no Quadro 1. Observa-se que as substâncias antimicrobianas presentes nos extratos exibiram atividade diferencial, com relação às fitobactérias estudadas, no sentido de que as espécies patogênicas para o fumo mostraram-se insensíveis e as não-patogênicas apresentaram diferentes graus de sensibilidade. Geralmente, admite-se que as plantas tenham mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos e que as fitoalexinas sejam importantes mecanismos de defesa pós-infeccional (8, 35, 36). Assim, um patógeno qualquer não seria capaz de infectar o fumo porque não ocorreria a produção de fitoalexinas, ou porque seria insensível às fitoalexinas produzidas, ou, ainda, porque seria capaz de metabolizá-las, transformando-as em compostos não-tóxicos (3, 22). Obviamente, a produção de fitoalexinas seria um dos muitos mecanismos de defesa da planta contra o estabelecimento da infecção (29).

Indiscutivelmente, a ocorrência de compatibilidade/incompatibilidade em interações patógeno-planta implica a presença de um ou vários mecanismos de reconhecimento celular (4, 9, 28, 30).

KEEN (15) menciona interessante teoria que correlaciona compatibilidade e produção de fitoalexinas pela planta. Postula que a planta reconheceria patógenos incompatíveis, o que desencadearia a síntese de fitoalexinas no local da infecção. Patógenos compatíveis, não sendo reconhecidos como tal, não acarretariam a síntese e acúmulo de quantidades significantes de fitoalexinas. O reconhecimento do patógeno incompatível dar-se-ia, possivelmente, entre macromoléculas presentes na superfície das células do hospedeiro e do patógeno. Havendo reconhecimento, em termos de complementaridade molecular, um estímulo seria levado ao núcleo, o que acarretaria o envio, ao citoplasma, de mRNAs, que carregariam consigo a codificação genética para a síntese de enzimas que participariam das rotas metabólicas de síntese das fitoalexinas. Esse estímulo seria transmitido até as células adjacentes. O patógeno compatível não seria reconhecido, não ocorreria o estímulo e não se daria a síntese de fitoalexinas.

Observando o Quadro 1, verificam-se duas aparentes contradições, mas há uma explicação: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (isolamento de feijão) foi sensível. Esse isolamento, apesar do nome, não é patogênico para o fumo. Também foi sensível *Pseudomonas solanacearum*, espécie patogênica para o fumo. Contudo, trata-se de um isolamento de batata, e sua patogenicidade para o fumo não foi testada.

4. RESUMO

Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. 'Turkish') foram inoculadas de uma sus-

QUADRO 1 - Atividade "in vitro" das substâncias com propriedades antimicrobianas presentes em extratos de folha de fumo, exibindo resposta hipersensível à inoculação do patógeno incompatível *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. Nos ensaios foram utilizadas fitobactérias patogênicas e não-patogênicas para o fumo

Microrganismos-teste	Procedência*	Área do halo de inibição (cm ²)
<i>P. syringae</i> pv. <u>tabaci</u> (isolada de fumo)	d	0
<i>P. cichorii</i>	b	0
<i>P. syringae</i> pv. <u>angulata</u>	d	0
<i>Agrobacterium radiobacter</i> pv. <u>tumefaciens</u>	a	0
<i>Erwinia carotovora</i> pv. <u>carotovora</u>	b	0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <u>campestris</u>	a	1,8
<i>X. campestris</i> pv. <u>cassavae</u>	e	1,5
<i>X. campestris</i> pv. <u>manihotis</u>	a	2,5
<i>P. solanacearum</i>	b	2,5
<i>P. syringae</i> pv. <u>tabaci</u> (isolada de feijão)	b	3,2
<i>C. michiganense</i> pv. <u>michiganense</u>	b	4,5
<i>P. syringae</i> pv. <u>pisii</u>	c	4,8

* a. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia.

b. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Biologia Vegetal.

c. American Type Culture Collection (ATCC).

d. Universidade de Wisconsin, Departamento de Fitopatologia.

e. Centro de Agricultura Tropical (CIAT), Colômbia.

pensão de células do patógeno incompatível *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. Vinte e quatro horas após, porções do limbo foliar, com sintomas típicos de reação de hipersensibilidade, foram submetidas à extração, pelo método de difusão facilitada (17), em etanol, a 40%. O extrato etanólico, concentrado, a vácuo, foi fracionado com acetato de etila. A fração acetato de etila revelou conter substâncias com propriedades antimicrobianas. Fitobactérias patogênicas para o fumo revelaram-se insensíveis à atividade presente no extrato, ao passo que as não-patogênicas para o fumo tiveram sua multiplicação inibida.

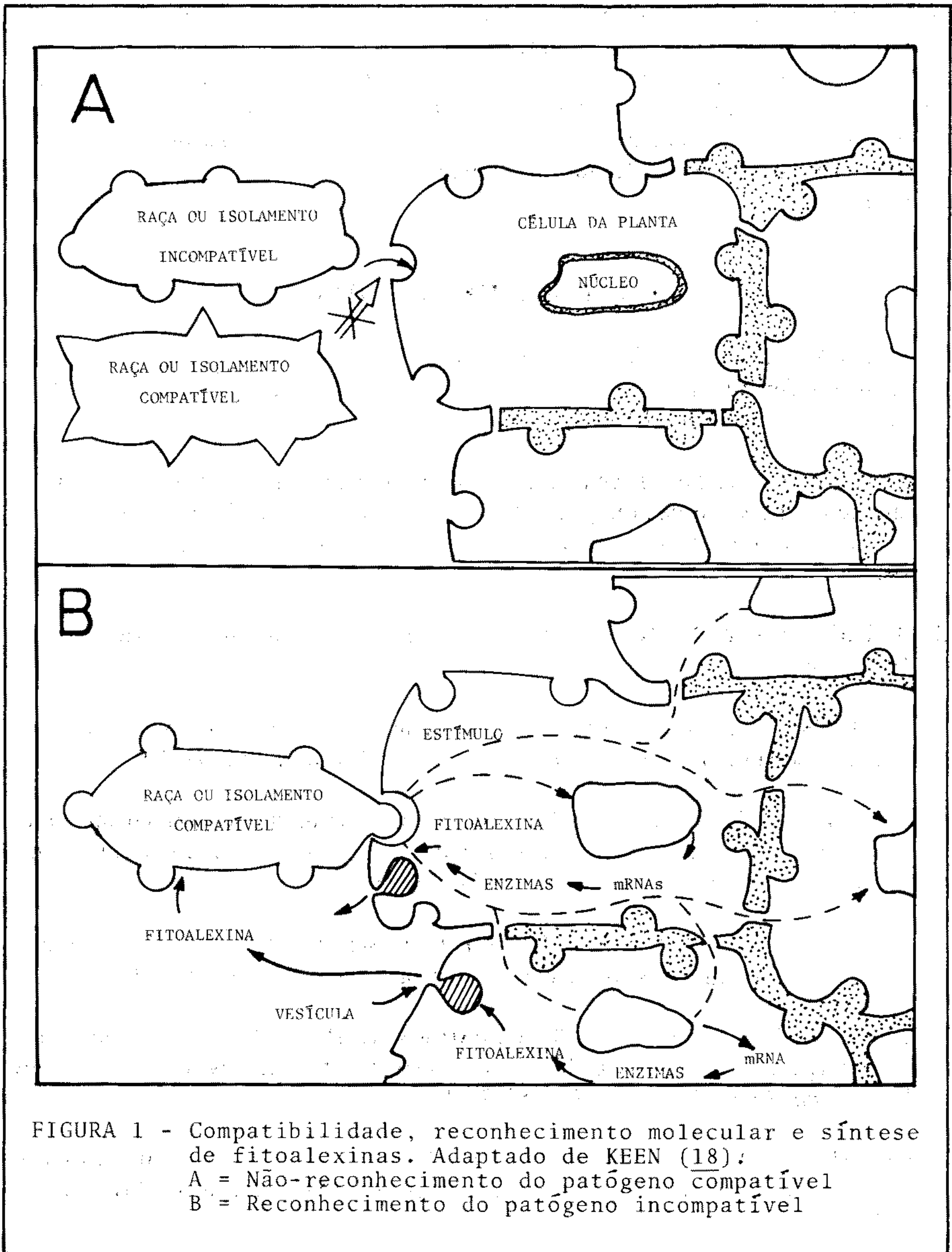


FIGURA 1 - Compatibilidade, reconhecimento molecular e síntese de fitoalexinas. Adaptado de KEEN (18):
 A = Não-reconhecimento do patógeno compatível
 B = Reconhecimento do patógeno incompatível

5. SUMMARY

(PHYTOBACTERIA SENSITIVITY TO ANTIMICROBIAL SUBSTANCES PRESENT IN EXTRACTS OF TOBACCO LEAVES INNOCULATED WITH THE INCOMPATIBLE PATHOGEN)

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. 'Turkish') were inoculated with a cell suspension of the incompatible pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *lisi*. Twenty four

hours after inoculation, leaf blade sections showing symptoms of hypersensitive reaction were extracted by the facilitated diffusion technique (17) in 40% ethanol and the diffusate, after concentration in a flask evaporator, was extracted with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction showed to contain antimicrobial substances. Plant pathogenic bacteria compatible with the tobacco plant were insensitive to those antimicrobial substance while the incompatible bacteria had their multiplication inhibited.

6. LITERATURA CITADA

1. BAILEY, J.A.; CARTER, G.A. & SKIPP, R.A. The use and interpretation of bioassays for fungitoxicity of phytoalexins in agar media. *Physiological Plant Pathology*, 8: 189-194. 1976.
2. BAILEY, J.A. & DEVERALL, B.J. Formation and activity of phaseolin in the interaction between bean hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) and physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, 1: 435-449. 1971.
3. BAILEY, J.A. & MANSFIELD, J.W. *Phytoalexins*. Glasgow, Blackie & Sons, 1982. 334 p.
4. CALLOW, J.A. Recognition, resistance and the roles of plantlectins in host-parasite interactions. *Advances in Botanical Research*, 4: 2-44, 1974.
5. CHEEMA, A.S. & HAARD, N.F. Induction of rishitin and lubimin in potato tuber discs by non-specific elicitors and the influence of storage conditions. *Physiological Plant Pathology*, 13: 233-240. 1978.
6. GNANAMANICKAM, S.S. & SMITH, D.A. Selective toxicity of isoflavonoid phytoalexins to gram-positive bacteria. *Phytopathology*, 70: 894-896. 1980.
7. GUEDES, M.E.M.; KUC, J. & HAMMERSCHMIDT, R. Accumulation of six sesquiterpenoid phytoalexins in tobacco leaves infiltrated with *Pseudomonas lachrymans*. *Phytochemistry*, 21: 2987-2988, 1982.
8. HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B. (Ed.). *Plant Disease – An Advanced Treatise*. Vol. V. How plant defend themselves. New York, Academic Press, 1972. 502 p.
9. HUANG, P-Y.; HUANG, J. & GOODMAN, R.N. Resistance mechanisms of apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora*. *Physiol. Plant Pathol.*, 6: 283-287, 1975.
10. INGAHAM, J.L.; KEEN, N.T.; MULLERIN, L. & LYNE, R.L. Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean (*Glycine max*). *Phytochemistry*, 20: 795-798, 1981.
11. JONES, D.R.; UNWIN, C.H. & WARD, E.W.B. The significance of capsidiol