

**PRODUÇÃO E ACÚMULO DE SUBSTÂNCIAS COM
CARACTERÍSTICAS DE FITOALEXINA EM
FOLHAS DE FUMO INOCULADAS DO
PATÓGENO INCOMPATÍVEL
Pseudomonas syringae, PV.
pisi, COM RELAÇÃO
AO TEMPO^{1/}**

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

1. INTRODUÇÃO

Em associações incompatíveis patógeno-hospedeiro, mormente naquelas que resultam em resposta hipersensível da planta, geralmente ocorre a produção de fitoalexinas (1, 4, 11). Comumente, tanto a síntese como o acúmulo de fitoalexinas ocorrem com muito mais intensidade nas associações incompatíveis (2, 12, 13, 18). Parece haver correlação entre tempo após o estímulo e acúmulo de fitoalexinas, tanto para eliciadores bióticos como para eliciadores abióticos. LYON e WOOD (12), inoculando folhas de feijoeiro com raças de *Pseudomonas phaseolicola*, observaram que as fitoalexinas cumestrol e phaseolina podiam ser detectadas pouco tempo após a inoculação. A concentração desses compostos aumentava exponencialmente após alguns dias, tendendo a permanecer estável, ou decrescer, posteriormente.

O objetivo deste trabalho foi estudar a dinâmica de produção e acúmulo de fitoalexinas, em relação ao tempo, em folhas de fumo inoculadas do patógeno incompatível *Pseudomonas syringae*, pv. *pisi*.

^{1/} Aceito para publicação em 10.01.89.

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

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Plantas-teste

Sementes de fumo (*Nicotiana tabacum*, cv. "Turkish") foram semeadas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Passados 30 dias, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno, com solo rico em matéria orgânica, previamente esterilizado com brometo de metila.

2.2. Origem e cultivo dos microrganismos-teste

As culturas fúngicas e bacterianas usadas neste trabalho eram originárias da coleção de culturas do Departamento de Fitopatologia da UFV. Os fungos foram cultivados em meio de BDA (20) e as bactérias em meio de KADO 523 (16): caseína ácida hidrolisada, 8 g; extrato de levedura, 4 g; K_2HPO_4 , 2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 g; ágar, 15 g; água destilada, 1000 ml. Todas as culturas foram preservadas em geladeira, a 4°C, e as incubações realizadas a 28°C.

2.3. Inoculação das plantas-teste

Pseudomonas syringae, pv. *pisi*, foi repicada para meio de KADO 523 (16) e incubada, a 28 °C/24-48 h. Foi preparada uma suspensão de células bacterianas em água estéril, suspensão cuja concentração foi ajustada, em espectrofotômetro, para $DO_{550} = 1,0$, o que corresponde a, aproximadamente, 10^9 células/ml. De sete a oito folhas completamente desenvolvidas de cada planta foram infiltradas da suspensão bacteriana, por meio de agulha hipodérmica (9, 10, 17). Como controle, foram utilizadas plantas infiltradas de água. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em condições ambientes de laboratório.

2.4. Obtenção de extratos da planta-teste inoculada

Foi utilizada a técnica de difusão facilitada, idealizada por KEEN (6, 7) e utilizada por SILVA (18) e SILVA e Romeiro (19) em trabalho semelhante. Secções de limbo foliar previamente inoculadas foram imersas em etanol, a 40%, infiltradas, a vácuo, e deixadas sob agitação por 12 h, à temperatura ambiente. Passado esse tempo, o tecido vegetal foi removido, por filtração, e o extrato etanólico concentrado, em rotavapor, para um terço do volume original. A seguir, o extrato concentrado passou por extração, com acetato de etila p.a. A fração acetato de etila foi, então, evaporada, até a secagem completa, ressuspensa em pequeno volume do mesmo solvente (0,5 ml/g de tecido fosco) e armazenada em congelador, até o momento de utilização.

Como o objetivo do trabalho foi estudar a dinâmica de produção e acúmulo de fitoalexinas em relação ao tempo, foram feitas extrações 0, 6, 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação. Em todos os casos, partiu-se de 10 g de tecido inoculado.

2.5. Bioensaios utilizados

A quantificação de fitoalexinas, em relação ao tempo de inoculação, foi feita pelo uso de bioensaios, quando *Thielaviopsis paradoxa* e *Corynebacterium michiganense*, pv. *michiganense*, foram escolhidas como organismos-teste. Na bioauto-

grafia (1, 2, 3, 8, 18) foi utilizada *T. paradoxa* como microrganismo-teste. Para tanto, foram usadas placas de sílica-gel, para cromatografia de camada fina (20 x 20 cm, com 0,25 mm de espessura, com indicador de fluorescência) (18, 19). Amostras de 40 µl de cada extrato foram aplicadas em pontos espaçados de 4 cm, sobre uma linha paralela ao bordo inferior da placa, a 2 cm deste. O sistema de solventes utilizados foi clorofórmio/acetona/NH₄OH (50 v: 50 v: 1 v), conforme KEEN (6), e a corrida cromatográfica foi interrompida quando o solvente havia passado 15 cm além da deposição das amostras. Feito isso, os cromatogramas foram secos e levados a um espessor de camadas, onde receberam um filme uniforme, de 1 mm de espessura, de BDA semi-sólido, fundente, com conídios de *T. paradoxa*. Para tanto, 25 ml de suspensão de conídios, com 2 x 10⁶ conídios/ml, foram adicionados a 75 ml de meio. Após a solidificação do meio, as placas foram mantidas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 48 h, quando as áreas dos halos de inibição foram estimadas.

No bioensaio aqui denominado bioensaio em placa (5) foram utilizados tanto *T. paradoxa* como *C. michiganense*, pv. *michiganense*, como organismos-teste. Para tanto, 10 ml de meio de KADO 523 (16) foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, foram vertidos 4 ml de meio semi-sólido, ao qual células dos organismos-teste haviam sido incorporadas, para formar uma sobrecamada. Discos esterilizados de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos de 40 µl de extratos obtidos em diferentes períodos de tempo após a inoculação. Após a evaporação do solvente, os discos foram depositados na superfície da sobrecamada, as placas incubadas, a 28°C, e estimados os diâmetros dos halos de inibição, após 24 h (bactéria) ou 48 h (fungo). Discos embebidos de acetato de etila foram usados como controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado dos bioensaios, empregados na quantificação das substâncias com propriedades antimicrobianas presentes nos extratos, obtidos em diferentes períodos de tempo após a inoculação, acha-se na Figura 1 (A, B e C). O exame das figuras sugere que as curvas são semelhantes, no sentido de que todas indicam que a produção de fitoalexinas inicia-se rapidamente e atinge um máximo, para, depois, permanecer estável, ou decrescer. Resultados análogos foram obtidos por CHEEMA e HAARD (3) e REILLY e KLARMAN (15), estudando a produção de fitoalexinas, por plantas, como resposta a eliciadores abióticos. Também O BRIEN e WOOD (14), assim como LYON e WOOD (12), observaram resultados semelhantes quando plantas de feijoeiro foram inoculadas de uma raça incompatível de *P. phaseolicola*.

Com relação aos bioensaios com *T. paradoxa*, a técnica de bioautografia foi mais sensível, permitindo a detecção de fitoalexinas 6 h após a inoculação, ao passo que o bioensaio em placas só permitiu essa detecção 12 h após a inoculação. No caso de *C. michiganense*, pv. *michiganense*, não foi utilizada bioautografia, devido à ocorrência de alta taxa de contaminações, o que confundia e comprometia os resultados. Todavia, o bioensaio em placas foi suficientemente sensível para detectar fitoalexinas 6 h após a inoculação.

Feita a infiltração de folhas de fumo com o patógeno incompatível *P. syringae*, pv. *pisi*, os tecidos do limbo foliar permaneceram com aspecto normal algumas horas depois. Contudo, 24 h após, visualizava-se acentuado dessecamento e necrose dos tecidos inoculados. É possível que haja uma correlação entre necrose e acúmulo dessas substâncias antimicrobianas (2) nos tecidos, com resposta hipersensível ao patógeno incompatível.

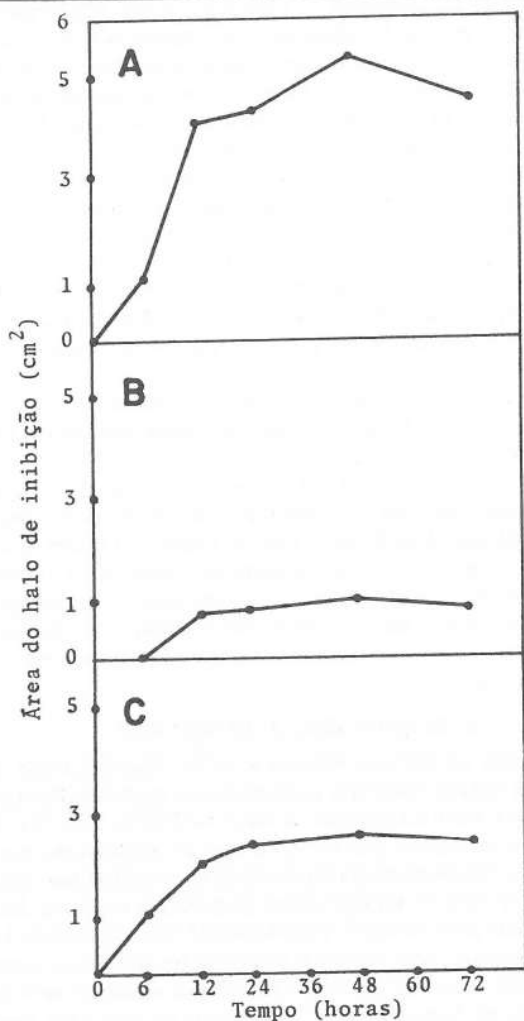


FIGURA 1 - Produção e acúmulo de substâncias com propriedades antimicrobianas em plantas de fumo inoculadas de *Pseudomonas syringae*, pv. *pisi*, detectáveis pelo uso de três organismos-teste em bioensaio. A = Bioautografia com *Tielaviopsis paradoxa*. B = Bioensaio em placas com *T. paradoxa*. C = Bioensaio em placa com *Corynebacterium michiganense*, pv. *michiganense*.

4. RESUMO

Folhas de fumo foram inoculadas da fitobactéria incompatível *Pseudomonas syringae*, pv. *pisi*, por infiltração com seringa hipodérmica. Zero, 6, 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação, secções de limbo foliar infiltradas foram colhidas e submetidas à extração, pelo método de difusão facilitada, em etanol, a 40%. Os difusatos, con-

centrados em rotavapor e fracionados em acetato de etila, tiveram a atividade antimicrobiana testada contra *Thielaviopsis paradoxa* (bioautografia e bioensaio em placa) e *Corynebacterium michiganense*, pv. *michiganense* (bioensaio em placa). A concentração de compostos com atividade antimicrobiana, em todos os casos, foi nula no momento da inoculação (tempo zero), tendendo a aumentar com o tempo, permanecendo estável, ou decrescendo, após 12-24 horas.

5. SUMMARY

(PRODUCTION AND ACCUMULATION OF SUBSTANCES WITH CHARACTERISTICS OF PHYTOALEXINS IN TOBACCO LEAVES INNOCULATED WITH THE INCOMPATIBLE PATHOGEN *Pseudomonas syringae* pv. *pti* IN RELATION TO TIME)

Tobacco leaves were inoculated with the incompatible pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *pti* by using the leaf infiltration technique. After 0, 6, 12, 24, 48, and 72 hours infiltrated leaf tissue was harvested and extracted by the facilitated diffusion technique in 40% ethanol. The diffusates were concentrated in a flask evaporator and extracted with ethyl acetate. Quantification of antimicrobial activity in the extracts was then performed by using bioassays against *Thielaviopsis paradoxa* (bioautography and paper disc method) and *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (paper disc method). The concentration of antimicrobial compounds was undetectable at zero time but showed a tendency to increase after some hours, remaining stable after 12-24 hours.

6. LITERATURA CITADA

1. BAILEY, J.A. & MANSFIELD, J.W. *Phytoalexins*. London, Blackie & Sons, 1982. 334 p.
2. BAILEY, J.A.; VINCENT, G.G. & BURDEN, R.S. Diterpenes from *Nicotiana glutinosa* and their effect on fungal growth. *Journal of General Microbiology*, 85:87-94. 1974.
3. 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.
4. CRUICKSHANK, I.A.M. Phytoalexins. *Annual Review of Phytopathology*, 1: 351-374. 1963.
5. GNANAMANICKAM, S.S. & MITH, D.A. Selective toxicity of isoflavonoid phytoalexins to gram-positive bacteria. *Phytopathology*, 70:894-896. 1980.
6. KEEN, N.T. Phytoalexins: efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. *Phytopathology*, 68:1237-1239. 1978.
7. KEEN, N.T. The isolation of phytoalexins from germinating seeds of *Cicer arietinum*, *Vigna sinensis*, *Arachis hypogea*, and other plants. *Phytopathology*, 75:91-92. 1975.

8. KEEN, N.T. TLC bioassay for antifungal substances using *Cladosporium cucumerinum*. *Phytopathology*, 61:1084. 1971.
9. KIRALY, Z.; KLEMENT, Z; SOLYMOSY, F. & VOROS, J. *Methods in Plant Pathology*. Budapest, Kiadó, 1970. 508 p.
10. KLEMENT, Z. & GOODMAN, R.N. The hypersensitive reactions to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5:17-44. 1967.
11. KUC, J.A. Phytoalexins. *Annual Review of Phytopathology*, 10:207-232. 1972.
12. LYON, F.M. & WOOD, R.K.S. Production of phaseollin, cumestrol and related compounds in bean leaves inoculated with *Pseudomonas* spp. *Physiological Plant Pathology*, 6:117-124. 1975.
13. MANSFIELD, J.W. Mechanism of Resistance to *Botrytis*. In: COLEY-SMITH, J.R.; JARVIS W.R. & VERHOEFF, K. (ed.). *The Biology of Botrytis*. New York, Academic Press, 1980. p. 181-218.
14. O' BRIEN, F. & WOOD, R.K.S. Role of ammonia in infection of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas* spp. *Physiological Plant Pathology*, 3:315-325, 1973.
15. REILLY, J.J. & KLARMAN, W.L. The soybean hydroxiphaeollin induced by fungicides. *Phytopathology*, 62:1113-1115. 1972.
16. ROMEIRO, R.S. *Identificação de Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa, Imp. Univ., UFV, 1976. 91 p.
17. ROMEIRO, R.S. Reação de hipersensibilidade induzida por bactérias fitopatogênicas. *Seiva*, 33:13-40. 1973.
18. SILVA, T.D. *Produção de substâncias com características de fitoalexinas em resposta à inoculação de Pseudomonas syringae pv. pisi em plantas de fumo*. Viçosa, UFV, 1982. 53 p. (Tese de Mestrado).
19. SILVA, T.D. & ROMEIRO, R.S. Possível envolvimento de fitoalexinas na resposta hipersensível de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) à inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. pisi. *Fitopatologia Brasileira* 7:558, 1982. (Abstract).
20. TUTTLE, J. *Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria*. Minneapolis, Burgess, 1969. 239 p.