



RESPOSTAS DE LIGNIFICAÇÃO EM FOLHAS DE Videira SUBMETIDAS A FLUXO DE AR QUENTE

SIDIMARA BASSO MAGON¹; FÁBIO ROSSI CAVALCANTI²; JOSÉ EDUARDO BOFFINO DE ALMEIDA MONTEIRO³

INTRODUÇÃO

As peroxidases (GPX) são glicoproteínas que, em situações de estresse, podem atuar em um processo de lignificação, promovendo a ligação entre monolignóis parcialmente oxidados, num processo de enrijecimento de parede celular que retarda o parasitismo fúngico (CAVALCANTI et al., 2007). As polifenoloxidasas (PPO) de plantas atuam de modo complementar à formação de lignina, pois participam da síntese de melaninas a partir de o- e p- difenóis, que são oxidados a quinonas que, por sua vez, se ligam espontaneamente (ALAGAR et al, 2010). É conhecido que a célula da videira, quando ameaçada por parasitismo, investe energia na síntese de compostos fenólicos antimicrobianos chamados por fitoalexinas, notadamente o resveratrol e derivados (viniferinas), e antocianinas (LIMA et al, 2012). Nas áreas de produção da uva da região da Serra Gaúcha, equipamentos empregando a tecnologia TPC (*Thermal Pest Control*), que promove um fluxo de ar quente (60 a 120° C) na copa das plantas, têm sido usados nos últimos anos para o controle de doença da videira, principalmente o míldio. Considera-se a hipótese de que um dos mecanismos biológicos para a redução de lesões esteja associado ao enrijecimento de parede celular promovido pelo fluxo de ar quente. O estudo teve como objetivo monitorar enzimas relacionadas à síntese de lignina (GPX) e melanina (PPO), e polímeros derivados do ácido tioglicólico, a partir da imposição de um fluxo de ar quente, em duas temperaturas (60 e 120° C), em plantas de videira Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) e Bordô (*V. labrusca*).

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas das variedades Cabernet Sauvignon (CS) e Bordô, em condições de casa de vegetação (Embrapa Uva e Vinho, lat.: 29,1° S, lon.: 51,5° O) cultivadas em sacos plásticos com substrato 2:0,5:1 areia/argila/húmus, 45 dias após rebrota, foram submetidas a dois tratamentos térmicos. Cada tratamento consistiu na aplicação de um fluxo (500 L min⁻¹) de ar quente por 0,5 s, em única aplicação, simulando o fluxo que é expelido pelo equipamento TPC a uma temperatura de 60° C e 120° C. O grupo controle (Ctrl) permaneceu com as folhas expostas à temperatura ambiente

¹ Estudante de graduação, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, e-mail: sidimarabasso@yahoo.com.br

² Eng. Agr., pesquisador Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: rossi@cnpuv.embrapa.br

³ Eng. Agr., pesquisador Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: monteiro@cnpuv.embrapa.br

(aproximadamente 25° C) resultando em 3 tratamentos, ou seja, dois com tratamento térmico e um sem. De cada tratamento foram realizadas coletas de folhas para extração de proteínas solúveis totais, às 12, 24, 48 e 72 horas após tratamento (HAT), em três repetições por tratamento e tempo de coleta, perfazendo um esquema fatorial 2 x 3 x 4, dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas e resfriadas em nitrogênio líquido. A extração de proteínas solúveis totais foi realizada por maceração do tecido fresco em tampão fosfato de potássio (PBS) (100 mM, pH 8.0, 1 mM de PMSF, 2% PVP e NaCl 1 M), em uma relação 1:5 m/v. O extrato filtrado foi centrifugado por 13 min. a 4° C a 12600 x g e o sobrenadante recolhido. A dosagem de proteínas solúveis seguiu o método de Bradford (1976), em alíquotas e diluições adequadas para a curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). A determinação da atividade de GPX seguiu metodologia de Urbanek et al. (1991), com modificações. A mistura de reação conteve guaiacol 60 mM e H₂O₂ 30 mM, com diluições, tempo de reação e alíquotas para cada cultivar ajustadas para maximizar a catálise enzimática, com leitura em DO (densidade óptica) 480 nm. Para determinação da atividade de PPO, usou-se procedimento análogo ao utilizado para GPX, por meio da adição de pirocatecol (50 mM) na mistura de reação, e leitura DO 410 nm (GAUILLARD et al., 1993). Para os ensaios, uma unidade de atividade (UA) foi definida como a alteração de uma unidade DO, por miligrama de proteína, por minuto. Para quantificação de lignina, alíquotas de 0,2 mg de tecido foliar fresco foram homogeneizadas e incubadas com acetona PA 85% por 48 h, centrifugado a 7500 x g por 15 min. O precipitado foi seco e incubado com 5 mL de ácido tioglicólico em HCl 2 N durante 4 h. Após procedimento de lavagens e centrifugações, a absorbância a 280 nm foi medida e valores convertidos em curva padrão de alkali-2-hidroxi-propil éter (MONTIES, 1989). Variáveis estudadas foram analisadas por ANOVA e as variâncias submetidas a testes F, a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades das enzimas GPX nas plantas da variedade CS submetidas ao fluxo de ar quente de 120° C foram menores do que em plantas submetidas a 60° C, as quais mantiveram o mesmo nível do controle, durante o intervalo 12-72 HAT (Figura 1). De modo contrário, na cv. Bordô, os níveis de atividade da GPX entre 12-72 HAT nos tratamentos 60° C e 120° C, foram aumentados, em relação ao controle, sendo que em 120° C o aumento foi maior entre 12-48 HAT. Considerando atividades das enzimas PPO na cv. CS, no intervalo estudado, plantas expostas a 60° C e 120° C mostraram aumento significativo em relação ao controle. Na cultivar Bordô, aumentos nas atividades de PPO foram ainda mais evidentes, com magnitudes proporcionais aos níveis de temperatura do fluxo de calor aplicado sobre as folhas (Figura 1). Tanto na cv. CS quanto na cv. Bordô foi observado uma queda intrigante na concentração de fenóis hidrossolúveis no período 12-72 HAT, tanto nas plantas tratadas (ainda mais proeminente na cv. CS), quanto no grupo controle.

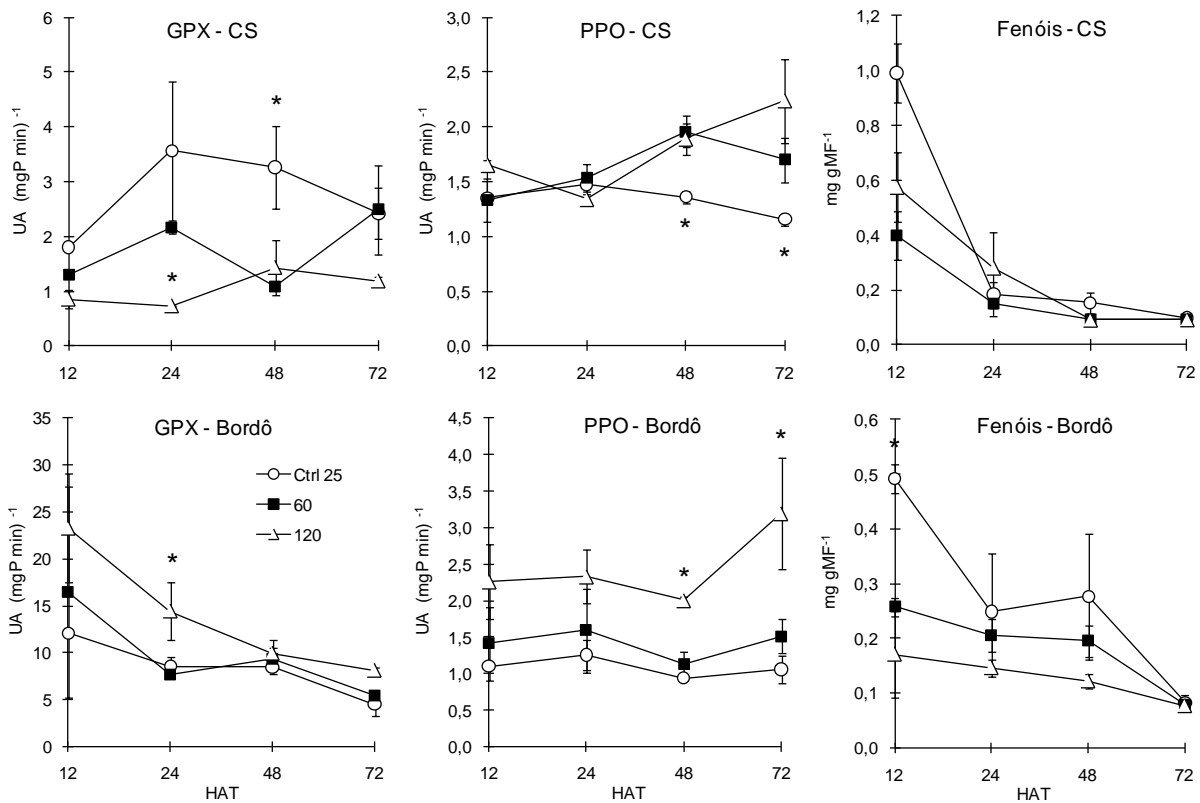


Figura 1 - Atividades das enzimas peroxidases (GPX), polifenoloxidasas (PPO) e fenóis hidrossolúveis totais em folhas de videira cvs. Cabernet Sauvignon e Bordô. Fluxo de ar quente, 60° C (-■-), 120° C (-△-) e plantas controle 25° C (Ctrl,-○-). Barras de erros indicam desvio-padrão da média. Asteriscos indicam diferenças significativas entre valores, em função da temperatura, em cada tempo, de acordo com o teste F ao nível de significância de 5%.

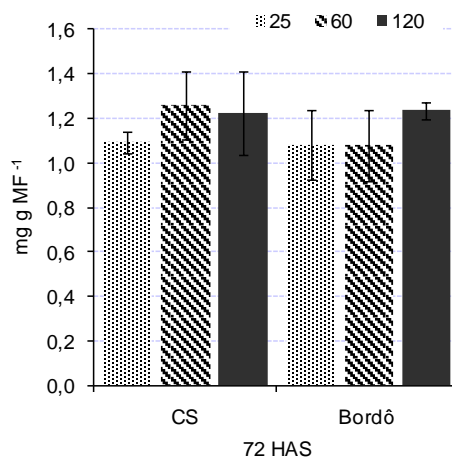


Figura 2 - Teores de lignina em folhas de videira, CS e Bordô, 72 HAT, em níveis de temperatura do fluxo de calor 25, 60 e 120° C. Barras de erros indicam desvio-padrão. Não há diferenças significativas entre as médias, de acordo com o teste F ($P < 0.05$).

Com relação aos teores de polímeros detectados pelo ensaio do ácido tioglicólico (lignina), houve uma resposta não significativa de aumento nas plantas de CS submetidas aos dois níveis de fluxo térmico, com relação ao controle 72 HAT (Figura 2). Plantas cv. Bordô expostas ao tratamento de 120° C mostraram um indício de acúmulo de lignina, com relação ao grupo controle e às plantas de 60° C. No entanto, em ambas as cultivares, diferenças significativas não foram encontradas, em 72 HAT (Figura 2).

CONCLUSÕES

Nas cultivares CS e Bordô, dois níveis de fluxo de ar quente sobre folhas de videira promoveram sensível redução nas atividades de peroxidases (a 120° C) e aumento nas atividades de PPO em ambas as cultivares, em 12-72 HAT. Até 72 HAT, não se evidencia acúmulo de derivados de tioglicólico (lignina, melanina) em folhas de ambas as cultivares.

REFERÊNCIAS

- ALAGAR, M.; SURESH, S.; SARAVANAKUMAR, D.; & SAMIYAPPAN, R. Feeding-induced changes in defence enzymes and PR proteins and their implications in host resistance to *Nilaparvata lugens*. **Journal of applied entomology**, Coimbatore, v. 134, n.2, p.123–131, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0418.2009.01461.x/pdf>. Acesso em: 05-07. 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosa* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 729-738, 2007.
- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 215, n. 1, p. 59-65, 1993.
- LIMA, M. R. M.; FERRERES F. & DIAS, A. C. P. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeoconiella chlamydospora*: changes in phenolic production, oxidative state and expression of defence-related genes. **Eur Journal Plant Pathol**, Braga, v. 132, p.133–146, 2012.
- MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed). **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. p. 113-158.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.