



FLUXO DE AR QUENTE EM FOLHAS DE Videira NÃO INDUZ AUMENTO DE TRÊS PR-PROTEÍNAS

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

INTRODUÇÃO

Enzimas como as β -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (CHI), e peroxidases (GPX) estão relacionadas à indução de resistência (IR) das plantas contra patógenos (SONG et al., 2011). As quitinases hidrolisam a quitina que é um polímero constituinte da parede de ascomicetos (OLIVEIRA et al., 2012), enquanto as β -1,3-glucanases quebram glucanas que reforçam a parede celular desses fungos verdadeiros (CHUNG et al., 1997). As peroxidases de plantas são glicoproteínas que oxidam os alcoóis hidroxicinâmicos, resultando na produção de radicais fenoximesoméricos que se reduzem espontaneamente durante a formação de lignina, como reforço da parede celular (CAVALCANTI et al., 2007). No cultivo da videira da região da Serra Gaúcha, máquinas empregando a tecnologia TPC (*Thermal Pest Control*), por indução de um fluxo de ar quente sobre a copa das plantas, têm sido usadas nos últimos anos para o controle de míldio e podridões do cacho. Uma das hipóteses relacionadas seria que um dos mecanismos biológicos para a redução de lesões esteja associada à ativação de IR nas células vegetais submetidas ao fluxo de ar quente da máquina. O objetivo deste trabalho foi monitorar níveis de atividade das proteínas relacionadas à patogênese (PR-*Proteins*), a partir de tratamentos de fluxo de ar quente em duas temperaturas (60 e 120°C) nas variedades 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) com 45 dias após rebrota, foram submetidas a dois tratamentos térmicos. Cada tratamento consistiu na aplicação de um fluxo de ar quente por 0,5 segundos, procurando imitar o fluxo de ar quente expelido pelo equipamento TPC, um a uma temperatura de 60°C e outro a 120°C. O grupo controle permaneceu com as folhas expostas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) resultando em 3 tratamentos, ou seja, dois com tratamento térmico e um

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

sem. De cada tratamento foram realizadas coletas de folhas para extração de proteínas solúveis totais às 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT), em seguida acondicionadas em papel laminado, resfriadas em nitrogênio líquido (NL2). A extração de proteínas solúveis totais foi realizada por maceração do tecido fresco em tampão fosfato de potássio (100mM, pH 8.0, 1mM de flúor metil sulfonil fluorídrico (PMSF), 2% polivinilpirrolidona (PVP) e NaCl 1M), em uma relação 1:5 m/v. O extrato filtrado foi centrifugado por 13 minutos 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 adequada para a curva padrão albumina sérica bovina (BSA). A determinação da atividade de GPX seguiu a metodologia descrita em Urbanek et al. (1991), com modificações. A mistura de reação conteve guaiacol 60mM e H₂O₂ 30mM, com diluições, tempo de reação e alíquotas para cada cultivar ajustadas para maximizar a catálise enzimática. Zimogramas para GPX foram feitos conforme Cavalcanti et al. (2007). Atividades de CHI foram determinadas pela adição de 70µL do extrato enzimático 1:1 à mistura com 130µL de acetato de sódio (50mM em pH 5,2) e 60µL de CM-Chitin-RBV (2 mg/mL; Loewe Biochemica GmbH), em microplacas de 96 cavidades com capacidade de 350 µL. Após incubação a 35°C, por 80 min, as amostras foram acidificadas com 50µL de HCl 0,5N, resfriadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas em 1450 x g por 10 min. Leituras a 492nm foram medidas após a parada da reação. Atividades de GLU foram conduzidas analogamente às reações de CHI, sendo que o substrato adicionado à mistura de reação foi CM-Curdlan-RBB (4mg/mL; Loewe Biochemica GmbH), com tempo de incubação de 120 min. As leituras foram feitas a 620nm (WIRTH; WOLF, 1990). Para todas as enzimas uma unidade de atividade (UA) foi definida como a alteração de uma unidade DO (densidade óptica), por miligrama de proteína, por minuto. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Fig. 1 houve decréscimo não significativo na atividade de GLU das plantas CS tratadas a 60°C e 120°C a partir de 48h, em relação às plantas controle. Com relação à Bordô foi observado comportamento diferente, na qual os níveis de atividade aumentaram em 120°C, enquanto que a 60°C, os níveis mantiveram-se iguais aos do controle. Considerando as respostas de CHI da CS, os níveis de atividade da enzima do tecido exposto a 120°C foram discretamente (não significativamente) maiores que os da temperatura controle ao longo do intervalo observado, os quais apresentaram o mesmo valor das plantas de CS submetidas a 60°C. De modo diferente, na cv. Bordô, a atividade de CHI a 120°C diminuiu, enquanto que plantas tratadas a 60°C mantiveram os níveis do controle, durante o intervalo. Considerando as respostas de GPX de CS é possível observar que, curiosamente, ao longo do intervalo, as atividades da enzima em tecido tratado por fluxo térmico de 120°C foram menores do que nas plantas submetidas a 60°C, que mantiveram o

nível de síntese das plantas controle. De modo contrário, na cv. Bordô os níveis de atividades da GPX em plantas submetidas a 120°C e a 60°C foram maiores do que das plantas controle, sendo que a 120°C o aumento foi significativamente maior.

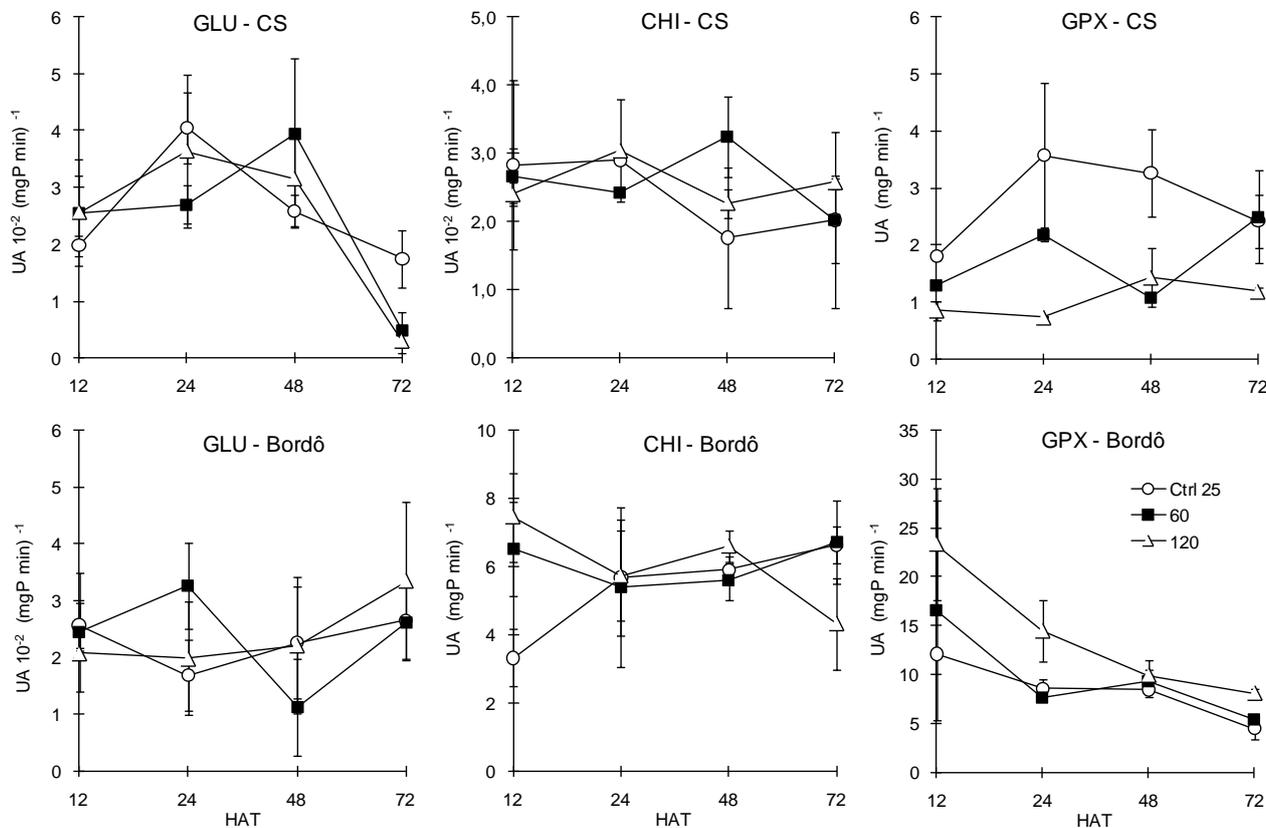


Figura 1 - Atividades de β-1,3-glucanases (GLU), quitinases (CHI) e peroxidases (GPX) em folhas de videira cvs. Cabernet Sauvignon (CS) e Bordô. Temperatura de fluxo de ar quente 60°C (-■-), 120°C (-△-) e 25°C (Ctrl, -○-). Respostas enzimáticas foram avaliadas 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento térmico. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

Considerando as células do parênquima foliar das cultivares CS e Bordô submetidas ao tratamento térmico, não foram observadas alterações significativas em termos de atividades de duas PR-proteínas, GLU e CHI, ao longo do tempo de avaliação (12-72 HAT). Diferenças mais claras (porém, não significativas em muitos pontos) foram verificadas em atividades de GPX, que diminuem ao longo do tempo em plantas de CS tratadas por fluxo de ar quente e, de modo inverso, aumentam na cv. Bordô, proporcionalmente ao nível de temperatura submetida à folha.

CONCLUSÕES

A despeito de alterações discretas, não significativas e contrárias nas atividades de peroxidases de plantas de videira cvs. Cabernet Sauvignon e Bordô não são observadas modificações nas respostas de atividades de β -1,3-glucanases e quitinases em ambas as variedades, entre 12-72 HAT, quando submetidas a dois níveis (60 e 120°C) de temperatura do fluxo de ar quente.

REFERÊNCIAS

- 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 pernicios* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 729-738, 2007.
- SONG, W.; MA, X.; TAN, H.; ZHOU, J. Abscisic acid enhances resistance to *Alternaria solani* in tomato seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Beijing, v.49, n. 7, p. 693-700, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942811001136>. Acesso em: 05-07. 2012.
- OLIVEIRA, J. T. A.; ANDRADE, N. C.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; SOARES, A. A.; GONDIM, D. M. F.; ARAÚJO-FILHO, J. H.; FREIRE-FILHO, F. R.; VASCONCELOS, I. M. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Ceará, v. 51, n. 1, p. 145-152, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942811003111>. Acesso em: 05-07. 2012.
- 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.
- WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, 1990.