

SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRÉ E PÓS-INFECCIONAIS EM FOLHAS DE FUMO¹

T.D. DA SILVA² e R.S. ROMEIRO³

RESUMO - Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) tiveram suas folhas inoculadas com o patógeno incompatível *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* pelo método de infiltração da suspensão bacteriana. Vinte e quatro horas após a inoculação, o tecido inoculado sofreu extração pelo método de difusão facilitada. O extrato, revelou conter atividade antimicrobiana. Embora com menor intensidade, extratos obtidos de folhas intactas, de folhas infiltradas com água ou de tecido sem sintomas adjacente, e áreas do limbo foliar exibindo reação de hipersensibilidade apresentaram alguma atividade antimicrobiana contra certos microrganismos testes.

Termos para indexação: *Nicotiana tabacum*, *Pseudomonas syringae*, suspensão bacteriana.

PRE AND POST-INFECTIONAL ANTIMICROBIAL SUBSTANCES IN TOBACCO LEAVES

ABSTRACT - Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants were inoculated with the incompatible pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* by the leaf infiltration method and the inoculated leaf tissue extracted 24 h after inoculation by using the facilitated diffusion technique. This extract showed to contain antimicrobial activity in bioassays against test organisms. In less extent, extracts obtained from intact leaves, water infiltrated leaves and symptomless tissue adjacent to tissue showing hypersensitive response also presented antimicrobial activity against some test microorganisms.

Index terms: *Nicotiana tabacum*, *Pseudomonas syringae*, bacteria suspension.

INTRODUÇÃO

As plantas possuem mecanismos de defesa contra a infecção por microrganismos. Esses mecanismos podem ser didaticamente agrupados em pré-infeccionais e pós-infeccionais (Horsfall & Cowling 1979a, Tarr 1972, Strobel & Mathre 1970). Substâncias tóxicas ao patógeno existentes em plantas constituem importantes mecanismos de defesa, sendo que essas substâncias podem ser tanto de natureza pré-infeccional, como compostos fenólicos (Walker & Link 1935, Tarr 1972) e quinonas (Goodman et al. 1967), quanto de natureza pós-infeccional, como fitoalexinas (Bailey & Mansfield 1982, Kuć 1972, Cruickshank 1963) e lectinas (Callow 1974, Romeiro 1980).

Neste trabalho, procurou-se detectar substâncias com propriedades antimicrobianas em folhas de fumo, antes e após a inoculação com o fitopatógeno incompatível *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) cv. Turkish cultivadas em casa de vegetação. Os microrganismos são advindos da coleção de culturas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Os fungos foram cultivados em meio de BDA (Tuite 1969) e as bactérias, em meio de Kado 523 (Romeiro 1976). Células do patógeno incompatível *P. syringae* pv. *pisi* foram suspensas em água destilada e a concentração do inóculo ajustada ao espectrofotômetro para OD₅₅₀ = 1, o que equivale, aproximadamente, a 10⁹ Cel/ml. Folhas de fumo completamente desenvolvidas foram infiltradas com a suspensão bacteriana, por meio de seringa hipodérmica, de agulha fina (Kiraly et al. 1970, Romeiro 1973). A injeção foi feita nos espaços intercelulares da metade de cada uma das folhas. Procedimento semelhante foi adotado para o caso de folhas infiltradas com água. Após a infiltração, as plantas foram mantidas à temperatura ambiente de laboratório. Foram preparados quatro tipos de extratos: 1. tecido foliar intacto; 2. tecido foliar infiltrado com água; 3. tecido foliar infiltrado com suspensão de células do patógeno incompatível; 4. tecido foliar de metade da folha oposta à metade infiltrada com o patógeno incompatível.

Vinte e quatro horas após as infiltrações, quando as folhas infiltradas como o patógeno incompatível exibiam sintomas de hipersensibilidade, procedeu-se à extração. Para tanto, foi utilizada a técnica idealizada por Keen (1978), denominada difusão facilitada, que consistiu em mergulhar porções de limbo foliar em etanol 40% em um frasco de Kitazato e aplicar um vácuo de 15 lb/pol²,

¹ Aceito para publicação em 13 de dezembro de 1984

² Eng. - Agr., M.Sc., UFSC/Centro de Ciências Agrárias, CEP 88000 Florianópolis, SC.

³ Eng. - Agr., Dr., UFV Dep. de Fitopat., CEP 36570 Viçosa, MG.

tantas vezes quantas fossem necessárias para o completo encharcamento dos tecidos. A seguir, os frascos foram submetidos a agitação moderada por doze horas e o tecido vegetal removido por filtração. O extrato etanólico foi então concentrado para 1/3 de seu volume num evaporador rotatório e, em seguida, fracionado com acetato de etila. A fração acetato de etila foi evaporada até secagem completa num evaporador rotatório e ressuspensa no mesmo solvente, à base de 0,05 ml/g de tecido fresco. Os extratos assim preparados foram armazenados em pequenos frascos de tampa rosqueável, a 5°C, até o momento de sua utilização.

Detecção e quantificação de atividade antimicrobiana nos extratos

A atividade dos extratos foi estimada pelo bioensaio em placa (Gnanamanickam & Smith 1980, contra os seguintes microrganismos: *Thielaviopsis paradoxa*, *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *C. michiganense* pv. *michiganense*, e expressa em termos de magnitude da área dos halos de inibição que se formaram. (Fig. 1).

Utilizaram-se placas-de-petri de 9 cm, que receberam uma camada inferior de 10 ml de meio de Kado 523

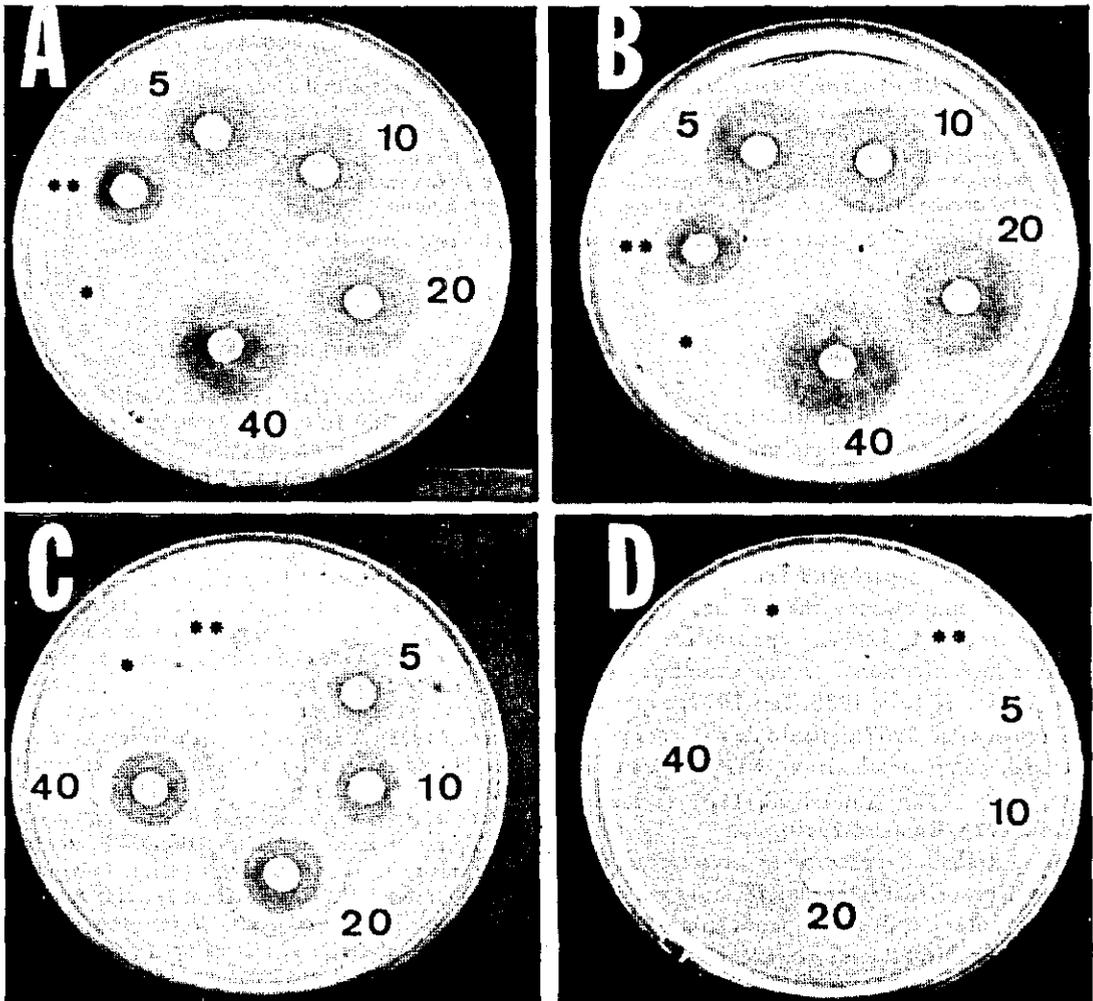


FIG. 1. Inibição do crescimento de microrganismos-teste por extratos de folha de fumo inoculadas com o patógeno incompatível *P. syringae* pv. *pisi* em bioensaios em placa.

A = *C. michiganense* pv. *michiganense*. B = *P. Syringae* pv. *pisi*. C = *T. paradoxa*. D = *P. syringae* pv. *tabaci*.

(*) = 40 µl de acetato de etila puro.

(**) = 40 µl de extrato de folha infiltrada com água.

(Romeiro 1976). Após a solidificação, verteu-se uma sobrecamada de 5 ml do mesmo meio (semi-sólido, contendo ágar a 0,75%) fundente, ao qual o microrganismo teste foi incorporado. Quando o microrganismo teste utilizado foi *T. paradoxa*, preparou-se suspensão fúngica, adicionando-se 5 ml de água estéril em tubos de ensaio contendo a cultura do fungo. Desta suspensão retirou-se uma alíquota de 1 ml, que foi adicionada ao meio fundente usado para preparo da sobrecamada. Para bioensaio com bactérias, procedeu-se ao semeio destas em meio líquido (meio de Kado, excluindo-se o ágar) e incubadas a 28°C. Em seguida, uma alíquota de 1 ml da cultura com 24 horas de idade foi adicionada aos 4 ml do meio fundente, usados para preparo da sobrecamada. Discos de papel-filtro (6 mm de diâmetro) esterilizados foram embebidos com os extratos testados (5 a 40 µl). Após a evaporação do solvente, foram dispostos na superfície da sobrecamada. Os diâmetros dos halos de inibição foram estimados 24 horas (bactérias) e 48 horas (*T. paradoxa*) após incubação a 28°C, e os resultados expressos em termos de área (cm²) dos halos de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios em placa-de-petri com os quatro extratos de folha de fumo contra os diferentes microrganismos testes, acham-se na Tabela 1.

O extrato IV (folhas de fumo inoculadas com o patógeno incompatível *P. syringae* pv. *pisi*) apresentou a mais conspícua atividade microbiana, tendo sido capaz de inibir *T. paradoxa*, *P. syringae* pv. *pisi* e *C. michiganense* pv. *michiganense*. Esses resultados encontram-se dentro do esperado, pois a inoculação de plantas com patógenos incompatíveis, mormente quando ocorre reação de hipersensibilidade, geralmente resulta na síntese e acúmulo de grandes quantidades de fitoalexinas (Bailey & Mansfield 1982, Kuć 1972, Cruickshank 1963, Muller 1959).

Essas fitoalexinas, por serem substâncias antimicrobianas de largo espectro (Bailey & Mansfield 1982), teriam inibido o crescimento dos organismos testes. Somente um organismo teste, *P. syringae* pv. *tabaci*, foi insensível à atividade antimicrobiana presente no extrato IV. Esse fitopatógeno é o único, dentre os microrganismos testados, a estabelecer, quando inoculado, uma associação compatível com a planta de fumo. Resultados experimentais têm demonstrado que patógenos compatíveis são geralmente pouco sensíveis ou insen-

TABELA 1. Atividade antimicrobiana nos extratos de folha de fumo contra diferentes microrganismos testes.

Microrganismo teste	Atividade antimicrobiana nos extratos*			
	I	II	III	IV**
<i>T. paradoxa</i>	-	-	-	1,9
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	-	-	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	-	-	2,0	5,3
<i>C. michiganense</i> pv. <i>michiganense</i>	2,3	2,8	3,8	4,9

* Atividade expressa em área (cm²) do halo de inibição.

** Extratos: I. folhas não infiltradas; II. meia folha oposta à metade infiltrada com o patógeno incompatível; III. folhas infiltradas com água destilada; IV. folhas infiltradas com suspensão de células do patógeno incompatível.

síveis às fitoalexinas produzidas por suas respectivas plantas hospedeiras (Bailey & Mansfield 1982). Assim, o fato de o patógeno compatível *P. syringae* pv. *tabaci* mostrar-se insensível à atividade microbiana presente no extrato IV confirma, de modo indireto, que esta atividade, possivelmente, deve-se a fitoalexinas que foram sintetizadas pela planta de fumo como resposta à inoculação com o patógeno incompatível.

Raciocinando-se em termos de produção de fitoalexinas como resposta da planta à inoculação com um patógeno incompatível, não se esperaria atividade alguma nos extratos I (folhas intactas) e III (folhas infiltradas com água destilada). Contudo, o extrato I foi ativo contra *C. michiganense* pv. *michiganense*, e o extrato III, contra *C. michiganense* pv. *michiganense* e *P. syringae* pv. *pisi*. Uma primeira hipótese a aventar seria a de que a planta de fumo não inoculada contem substâncias antimicrobianas de natureza pré-infeccional às quais somente *C. michiganense* pv. *michiganense* é sensível. É fato conhecido que plantas não inoculadas podem conter substâncias antimicrobianas (Horsfall & Cowling 1979b). Também Bailey et al. (1975), assim como Cruickshank et al. (1977), relatam a existência de substâncias antimicrobianas em plantas sadias de fumo. Se esta hipótese explica a sensibilidade de *C. michiganense* pv. *michiganense*

aos extratos I e III, ela não explica a sensibilidade de *P. syringae* pv. *pisi* ao extrato III, mas não ao extrato I. Assim, poder-se-ia postular, além da existência de substâncias antimicrobianas pré-infecciosas, a produção pela planta de fitoalexinas em pequena quantidade como resposta a eliciadores abióticos. Os dois microrganismos testes seriam, então, sensíveis a essa pequena quantidade de fitoalexinas, ao contrário dos demais. É fato cientificamente comprovado (Bailey & Mansfield 1982) que a produção de fitoalexinas por plantas pode ser ocasionada por eliciadores abióticos como radiações UV, metais pesados, ferimentos, certas substâncias químicas. No caso do extrato III (folhas infiltradas com água), as picadas da agulha bem como a penetração da água nos tecidos sob pressão poderiam ocasionar um nível de injúria mecânica suficiente para ocasionar a produção pela planta de pequenas quantidades de fitoalexinas. Deverall & Vessey (1969) relatam que extratos de folhas de *Vicia faba* injuriadas por trituração revelaram-se fungitóxicos.

O extrato II (meia folha adjacente à metade inoculada com o patógeno incompatível) só apresentou atividade contra *C. michiganense* pv. *michiganense*, à semelhança do extrato I. Novamente poder-se-ia aventar a hipótese da existência de substâncias antimicrobianas de natureza pré-infeccional. Esse resultado confirma as citações (Bailey & Mansfield 1982) de que fitoalexinas são de produção localizada e restritas ao local de infecção, não se distribuindo aos tecidos adjacentes, nem mesmo de uma região do limbo foliar para outra.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, J.A.; BURDEN, R.S. & VICENT, G.G. Capsidiol; an antifungal compound produced in *Nicotiana tabacum* and *N. clevelandii* following infection with tobacco necrosis virus. *Phytochemistry*, 14:597, 1975.
- BAILEY, J.A. & MANSFIELD, J.W. *Phytoalexins*. Glasgow, Blackie & Sons, 1982. 334p.
- CALLOW, J.A. Recognition, resistance and the roles of plant-lectins in host-parasite interactions. *Adv. Bot. Res.*, 4:2-44, 1974.
- CRUICKSHANK, I.A.M. *Phytoalexins*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1:351-74, 1963.
- CRUICKSHANK, I.A.M.; PERRIN, D.R. & MANDRYK, M. Fungitoxicity of duvatrienediols associated with the cuticular wax of tobacco leaves. *Phytopathol. News*, 90:243-9, 1977.
- DEVERALL, B.J. & VESSEY, J.C. Role of a phytoalexin in controlling lesion development in leaves of *Vicia Faba* after infection by *Botrytis* spp. *Ann. Appl. Biol.*, 63:449-58, 1969.
- GNANAMANICKAM, S.S. & SMITH, D.A. Selective toxicity of isolavonoid phytoalexins to gram-positive bacteria. *Phytopathology*, 70:894-6, 1980.
- GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z. & ZAITLIN, M. *The biochemistry and physiology of infectious plant disease*. Princeton, Van Nostrand, 1967. 354p. 1967. 354p.
- HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B., ed. *Plant disease an advanced treatise; how pathogens induce disease*. New York, Academic Press, 1979a. v. 4.
- HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B., ed. *Plant disease an advanced treatise; how plants defend themselves*. New York, Academic Press, 1979b. v.5.
- KEEN, N.T. *Phytoalexins; efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique*. *Phytopathology*, 68:1237-9, 1978.
- KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOSEY, F. & VÖRÖS, J. *Methods in plant pathology*. Budapest, Akademiai, 1970. 509p.
- KUC, J.A. *Phytoalexins*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 10:207-32, 1972.
- MULLER, K.O. *Hypersensitivity*. In: HORSFALL, J.G. & DIMOND, A.E., ed. *Plant pathology*. New York, Academic Press, 1959. v. 1, p.469-519.
- ROMEIRO, R.S. *An agglutination factor present in apple seeds*. Columbia, University of Missouri, 1980. 116p. Tese Doutorado.
- ROMEIRO, R.S. *Identificação de bactérias fitopatogênicas*. Viçosa, UFV, 1976. 91p.
- ROMEIRO, R.S. *Reação de hipersensibilidade induzida por bactérias fitopatogênicas*. *Seiva*, 33:13-40, 1973.
- STROBEL, G.A. & MATHRE, D.E. *Outlines of plant pathology*. New York, Van Nostrand, 1970. 465p.
- TARR, S.A.J. *The principles of plant pathology*. New York, Winchester Press, 1972. 632p.
- TUITE, J. *Plant pathological methods; fungi and bacteria*. Minneapolis, Burgess, 1969. 239p.
- WALKER, J.C. & LINK, K.P. Toxicity of phenolic compounds to certain onion bulb parasites. *Bot. Gaz.*, 96:468-84, 1935.