



AUMENTO DE POLIFENOLOXIDASE EM CAFEEIROS TRATADOS COM ÁCIDO SALICÍLICO E DESAFIADOS COM *COLLETOTRICHUM* SP.

Eduardo Silva Coqueiro¹, Clarice Santos Santana², Dandara Porto Pedreira³, Danila Souza Oliveira Coqueiro⁴

¹ Discente do Curso de Biotecnologia/ UFBA/ Vitória da Conquista, BA. dudousko@outlook.com

² Discente do Curso de Biotecnologia/ UFBA/ Vitória da Conquista, BA

³ Graduada em Biotecnologia/ UFBA/ Vitória da Conquista, BA

⁴ Docente da Universidade Federal da Bahia/ UFBA/ Vitória da Conquista, BA

RESUMO

O Brasil é o maior exportador de café no mercado mundial, ocupando a segunda posição entre os países consumidores da bebida. Entretanto, as doenças que atacam esse commodity ainda representam empecilhos que limitam a sua produção e qualidade, intervindo diretamente na economia, o que afeta tanto pequenos agricultores, quanto em escala empresarial. Dentre as doenças, as antracnoses causadas por fungos do gênero *Colletotrichum*, estão entre as principais que acometem essa cultura. Dessa forma, a indução de resistência por eliciadores como o ácido salicílico em plantas constitui uma estratégia promissora, pois permite a utilização de substâncias não nocivas à saúde humana, mas que promovem características agrônômicas desejáveis. O presente estudo avaliou a atividade da polifenoloxidase em mudas de café tratadas com AS e desafiadas com *Colletotrichum*. Foi utilizada a concentração de 1,25 mM quantificando a atividade das enzimas espectrofotometricamente. Dessa forma, observou-se que o AS apresentara atividade significativa sobre a enzima, a partir do segundo dia após a inoculação, sendo que esse efeito persistiu até o terceiro dia.

Palavras-chave: defesa, doença, fungo.

ABSTRACT

Brazil is the largest exporter of coffee in the world market, occupying the second position among the countries consuming the beverage. However, the diseases that attack this commodity still represent obstacles that limit its production and quality, intervening directly in the economy, which affects both small farmers and companies. Among the diseases, anthracnoses caused by fungi of the genus *Colletotrichum*, are among the main ones that affect this culture. Thus, the induction of resistance by elicitors such as salicylic acid in plants is a promising strategy because it allows the use of substances not harmful to human health, but which promote desirable agronomic characteristics. The present study evaluated the activity of polyphenoloxidase in AS-treated and *Colletotrichum*-challenged coffee seedlings. A concentration of 1.25 mM was used to quantify the enzyme activity spectrophotometrically. Thus, it was observed that AS had significant activity on the enzyme from the second day after inoculation and this effect persisted until the third day.

Key words: defense, disease, fungus.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC) o consumo de café (*Coffea L.*) no Brasil chegou a 21 milhões de sacas, no período de novembro de 2017 a outubro de 2018, o que representa um crescimento de cerca de 4,80% em relação a períodos anteriores. Tais dados servem para demonstrar a forma como a cultura é importante para o Brasil e sobretudo para a região Nordeste onde se caracteriza como uma das lavouras de maior produtividade e retorno financeiro.

Ademais, mesmo este apresentando essa grande importância, há uma série de problemas que afetam a produtividade dessa planta, dentre eles a antracnose, mal causado pelo fungo *Colletotrichum sp.*, caracterizada pela presença de manchas necróticas, de coloração que varia de tonalidades de parda a avermelhada e normalmente se encontram de formas irregulares distribuídas nas bordas da folha (SILVA et al., 2015).

Nesse cenário de ocorrências fitossanitárias, a saída mais comum encontrada pelos produtores para evitar maiores prejuízos é o uso de formas de controle químico, a exemplo os fungicidas que ocuparam, somente no ano de 2014, um mercado de U\$\$ 12.2 bilhões (ALMEIDA et al., 2017).

Visto os males que o uso dessas substâncias pode causar, atualmente, principalmente a saúde humana (OLIVEIRA-SILVA et al., 2000) tem-se buscado alternativas menos agressivas ao uso desses compostos e que não comprometem a qualidade do fruto ou o seu valor de prateleira. Nesse contexto, ferramentas de indução de resistência tem obtido um destaque cada vez maior, pois estas ativam mecanismos de defesa latentes na planta via uso de eliciadores, como o ácido salicílico (DA SILVA, 2015).

O ácido salicílico (AS) é uma molécula caracterizada como composto fenólico e encontrada em diversas plantas e que é ligada a uma ação sinalizadora de defesa contra diversos microrganismos, podendo culminar com a expressão de genes de resistência na planta (MAUCHMANI; MÉUTRAUX, 1998). Diversas pesquisas vêm mostrando que a aplicação exógena do ácido salicílico pode influenciar na manifestação dos sintomas ocasionados por diversas doenças em plantas, reduzindo-os, pois estão diretamente ligados acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) que atuam como defesa, como por exemplo a polifenoloxidase (SILVA, 2016; CAMPOS, 2004). Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a influência no aumento da atividade da enzima polifenoloxidase em mudas de café tratadas com AS.

MATERIAL E MÉTODOS

O *Colletotrichum sp.* foi obtido por isolamento indireto a partir de tecidos foliares de café com sintomas de antracnose. O material infectado foi cuidadosamente lavado com água, detergente e seco com papel filtro. Posteriormente, em câmara de fluxo, com o auxílio de lâmina previamente flambada, fragmentos de tecido foram retirados da área de transição (parte sadia e parte necrosada), transferidos para uma solução de álcool 70% por 60s e em seguida Hipoclorito de Sódio a 2% por 60s. Os fragmentos foram lavados em água destilada para remoção do excesso de hipoclorito e colocados de forma equidistante em placa de petri contendo meio Ágar-Água. Após o aparecimento das primeiras hifas, estas foram transferidas para placas contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (ALFENAS; MAFIA, 2007) as quais foram incubadas por sete dias em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas para utilização nos experimentos.

O AS foi preparado pela sua dissolução em etanol a 1% sendo utilizada a concentração de 1,25 mM e etanol 1% utilizado como controle (0mM). Após 48h dos tratamentos as plantas foram inoculadas com o fungo e, nos intervalos de tempo de 1, 2, 3 e 4 dias após a inoculação, amostras foliares foram coletadas, pesadas e congeladas.

A atividade de polifenoxidase, por sua vez, foi determinada pela conversão do catecol em quinona. Amostras de tecido foliar foram maceradas, homogeneizadas em 2,0 ml de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e centrifugados a 20.000 g por 30 min a 4 °C, obtendo-se o extrato proteico. O substrato foi o catecol na concentração de 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6.8). A reação se deu a partir da mistura de 900 mL do substrato de catecol com 100 mL do extrato proteico das amostras em temperatura de 30 °C. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Modelo 850Mi da Analyser) a 420 nm de forma direta por um período de 2 min (DUANGMAL; APENTEN, 1999).

Todos os experimentos foram conduzidos utilizando delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os resultados foram aplicados em teste de normalidade Shapiro-Wilk e ao apresentar normalidade foram destinados a ANOVA um critério e teste Tukey a 5% de significância ou Test-t de Student. Quando não houve distribuição normal dos dados utilizou-se Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls ou Mann Whitney. As análises foram feitas nos programas Bioestat 5.3 ou SASM-Agri.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada vez mais tem se obtido relatos na literatura acerca do potencial dos eliciadores e suas aplicações. Estudos já comprovam que a aplicação exógena de AS é capaz de ativar diversos mecanismos latentes de resistência na planta, além do acúmulo de proteínas relacionadas com tal sistema (ROCHA NETO, 2015).

Nesse trabalho, notou-se que o AS a 1,25 mM foi efetivo em relação a essa finalidade. A atividade da enzima polifenoloxidase das plantas tratadas com AS e desafiadas com *Colletotrichum sp.* apresentou uma diferença significativa em relação às plantas controle ao longo do tempo (Figura 1), sendo que essa diferença se mostrou de forma mais acentuada a partir dos 2 primeiros dias após a inoculação, e pode-se notar que a enzima apresentou uma taxa de aumento acentuada. A polifenoloxidase atua nos mecanismos de defesa da planta por possuir a funcionalidade de oxidar fenol e quinonas, que são compostos fenólicos tóxicos aos microrganismos (ZHENG et al., 1999).

Dessa forma, percebe-se que o tratamento exógeno com ácido salicílico tem se mostrado uma forma efetiva de induzir esses mecanismos de defesa latentes na planta e conseqüentemente dispensar uma demanda maior pelo uso de agrotóxicos nas lavouras.

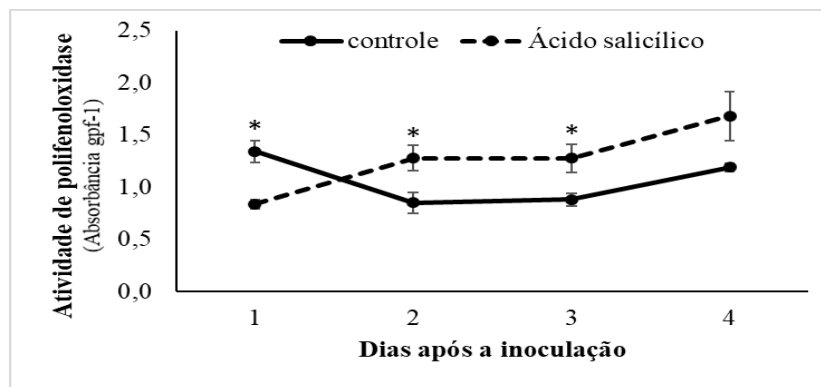


Figura 1. Atividade enzimática de polifenoloxidase em plantas de café ao longo de 4 dias após tratamento com AS 0 mM (Controle) e AS 1,25 mM e desafio com *Colletotrichum sp.* O asterisco (*) indica diferença significativa pelo Test-t de Student entre os tratamentos dentro de cada avaliação.

CONCLUSÕES

O uso do eliciador AS é uma ferramenta adicional no manejo contra o patógeno mostrando-se uma alternativa promissora ao uso de agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. **Indicadores da Indústria de Café** | 2018. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://twixar.me/IGJ1>. Acesso em: 5 jul. 2019.

ALFENAS, A. **Métodos em fitopatologia**. UFV, 2007.

ALMEIDA, V., et al. Uso de sementes geneticamente modificadas e agrotóxicos no Brasil: cultivando perigos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3333-3339, 2017.

CAMPOS, A., Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

DA SILVA, E., Elicidores na agricultura: Uma alternativa para indução de respostas em plantas. **VIII Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG campus Bambuí I Seminário dos Estudantes de Pós-graduação**. Campus Bambuí, Brasil, 2015.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A **Comparative study of polyphenoloxidases from taro (Colocasia esculenta) and potato (Solanum tuberosum var. Romano)**. Food Chemistry, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999

MAUCH-MANI; MÉTRAUX JP **Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attac**. **Annals of Botany**. v.82, n.5, 1998

OLIVEIRA-SILVA, Jefferson José et al. **Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries**. Human & experimental toxicology, v. 19, n. 3, p. 173-177, 2000.

ROCHA NETO, A.C, Maraschin, M. and Di Piero R.M. "**Antifungal activity of salicylic acid against Penicillium expansum and its possible mechanisms of action**." International journal of food microbiology 215 (2015): 64-70.

SILVA, M. D. S., SILVA, R. P. D., SOUZA, A. V. L. D., XAVIER, Y. P. M., OLIVEIRA, A. C. D., & Coqueiro, D. S. O. (2016). **Exogenous application of salicylic acid in yellow passion fruit for the control of fruit woodiness virus**. Arquivos do Instituto Biológico, 83.

SILVA, M. **Aplicação exógena do ácido salicílico em maracujazeiro-amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 83, p. 1-7, 2016.

ZHENG, C.; TENG, B.; GAO, F.; WU, Z. **Studies on the changes of superoxid dismutase, peroxidase and poliphenol oxidase in seed coat of soybeans after infection with soybean mosaic virus**. Scientia Agricultura Sinica Pequim, v.32, n.1, p.99-101, 1999.