

## **QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE (POD) EM LARANJA DOCE (*Citrus sinensis*) COM DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Andressa Cazetta (PIBIC/CNPq/UEM), William Mário de Carvalho Nunes (Orientador), e-mail: wmcnunes@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Agrárias/Maringá, PR.

**5.01.00.00-9 Agronomia/5.01.02.00-1 Fitossanidade**

**Palavras-chave:** peroxidase, xanthomonas, métodos

### **Resumo:**

O setor citrícola brasileiro apresenta grande influência na produção mundial de citros, porém apesar de seu grande potencial produtivo, sofre severos prejuízos devido às diversas doenças e pragas. Uma das doenças de grande influência é o Cancro Cítrico, do qual não existe ainda um controle ou cura eficaz. Nas plantas, a presença da Peroxidases pode auxiliar no processo de defesa contra patógenos, sugerindo a importância desta enzima nas mais diversas formas de defesa celular. Nos citros, alguns estudos mostram um aumento da atividade da Peroxidases a partir do momento em que se inicia a infecção. Ao quantificar e analisar se a enzima Peroxidase (POD) atua de maneira diferente quando analisadas folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) com diferentes métodos de inoculação da doença, notou-se que a atividade é mais efetiva quando há ferimentos por agulha e presença de inoculo e nessas condições a medida que os dias após a inoculação se estendem, sua atividade também aumenta.

### **Introdução**

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et. al., 2006) é a grande causadora do Cancro Cítrico, doença extremamente severa para a citricultura (GOTTWALD et al., 2002) que ocasiona uma redução drástica na produção de frutos e na renda do produtor, já que suas lesões afetam a comercialização da fruta in natura, seu processamento industrial e sua exportação.

A enzima peroxidase é uma glicoproteína que pode ser encontrada nas plantas, possui um papel metabólico muito importante, oxidando componentes potencialmente tóxicos, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio e os radicais livres. Ao oxidá-los, ela torna esses produtos menos nocivos à célula. A peroxidase também está relacionada à síntese de lignina e de etileno, auxiliando na defesa contra patógenos (KARSTEN, 2009).

Pensando em formas de defesa natural das plantas a patógenos, o objetivo do trabalho é quantificar e analisar a atividade enzimática da Peroxidase (POD) em folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) que estão submetidas a

diferentes métodos de inoculação da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, responsável pelo Cancro Cítrico.

## Materiais e métodos

Para o experimento, utilizou-se mudas de laranja doce (*Citrus sinensis*) do genótipo Pera IAC, provenientes do Viveiro de Mudas Pratinha, localizado no município de Paranavaí, Paraná. As mudas permaneceram em condições de casa de vegetação nas instalações do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) durante todo o experimento. Aos 50 dias antes da inoculação, as plantas foram podadas com o objetivo de obter folhas homogêneas entre 75 e 100% de expansão.

Para a inoculação da *X. citri* utilizou-se a estirpe Xcc 306, a qual tem seu genoma já sequenciado, obtida do acervo de culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). O qual foi preparado em tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0) e ajustado a  $10^8$  unidades formadoras de colônia mL<sup>-1</sup> (BELASQUE JR.; JESUS JR., 2006) com auxílio de um espectrofotômetro ajustado para leitura a 630nm.

Empregou-se três métodos de inoculação: a) perfuração do limbo foliar com agulha (0,55 x 0,20 mm), sendo realizadas 6 perfurações por folha; b) aspersão de suspensão bacteriana com borrifador, até o ponto de escorrimento; c) fricção de algodão embebido com suspensão bacteriana, sendo repetidas cinco fricções longitudinais. Cada método de inoculação teve 4 plantas com 20 folhas inoculadas em cada uma (repetições), sendo oito furos por folha.

Em cada avaliação, realizou-se três coletas de folhas distintas para analisar a atividade enzimática da Peroxidase: 1) um controle, com folhas livres de ferimentos e contato com o inoculo; 2) folhas com ferimentos por agulha sem presença de inoculo; 3) folhas com ferimentos por agulha ou outro método com presença de inoculo. Foram coletadas em torno de 20 folhas por variedade com o mesmo estágio de maturação e com boa sanidade, embrulhadas em papel alumínio, identificadas por parcelas e armazenadas em isopor com gelo ao 01 e 09 dias após a inoculação (DAI).

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN), da Universidade Estadual de Maringá e preparadas a partir da pesagem de 1g de folhas, trituradas em almofariz com 0,01 g de PVPP em 3 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7.0) com 3 mM de DTT 1 mM de EDTA, transferida para tubo Falcon de 15 mL e centrifugada à 10.000 giros em 4°C por 30 minutos. Subsequentemente, o sobrenadante foi transferido para micro tubos de 1,5 mL e armazenado à -80°C.

A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método descritos por Santos et al., (2004). A mistura de reação (2,6 mL) foi formada por tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 6,8), 2,58 mM de guaiacol e 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi iniciada com a adição do extrato enzimático (0,4 mL) previamente diluído de preparação. A oxidação do guaiacol foi quantificada aos 5 min à 470 nm de absorbância em espectrofotômetro e a atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção (25,5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). O

branco foi considerado a mistura da reação sem o extrato enzimático, sendo a atividade da POD expressa em  $\mu\text{mol}$  de tetraguaiacol  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de folha fresca. Os resultados foram avaliados através do teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade a fim de detectar diferença entre as médias.

## Resultados e Discussão

Os métodos de algodão e aspersão não desenvolveram sintomas da doença e, portanto, não participaram das avaliações que se seguiram. Com base nas análises estatísticas realizadas, ao observar a ação dos métodos de inoculação com e sem presença de bactéria, nota-se que no método onde temos a bactéria inoculada a partir de ferimentos com agulha, a atividade da enzima foi maior que nos outros dois métodos, que no caso, não tiveram diferença significativa, como é possível observar na Tabela 1.

**Tabela 1:** Atividade da enzima Peroxidase em relação aos tratamentos.

| Tratamentos* | Atividade da POD**<br>( $\mu\text{mol}$ de tetraguaiacol $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de folha fresca) |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SAG          | 3.596450 a1                                                                                               |
| CAG          | 5.832350 a1                                                                                               |
| CAG+BAC      | 6.606850 a2                                                                                               |

\*Legenda: SAG: tratamento sem agulha; CAG: tratamento com agulha; CAG+BAC: tratamento com agulha e bactéria.

\*\*Médias seguidas pelo mesmo número não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância

Quando, a partir das análises estatísticas, observa-se a atividade da Peroxidase com o passar dos dias após a inoculação, presente na Tabela 2, nota-se que à medida que a bactéria avança em seu ataque, a POD, trabalha buscando bloquear a ação do patógeno sob a planta, visando evitar os danos que a doença acarreta. Esses dados estão acordados com os resultados obtidos por Nanani (2017), onde notou-se também o aumento significativo da atividade da Peroxidase na variedade Pera IAC a medida que aumentou os dias após a inoculação, sendo que houve um pico aos 16 DAI que estaria relacionado à resposta de hipersensibilidade, na qual as plantas sob estresse acumulam mais  $\text{H}_2\text{O}_2$  no espaço intercelular, com o objetivo de conter o desenvolvimento do patógeno, impedindo que a doença evolua para outras partes da planta.

**Tabela 2:** Atividade da Peroxidase em relação aos dias após a inoculação.

| Dias após a inoculação | Atividade da POD<br>( $\mu\text{mol}$ de tetraguaiacol $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de folha fresca) |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                      | 4.240633 a1                                                                                             |
| 9                      | 6.449800 a2                                                                                             |

Os resultados obtidos podem estar relacionados também aos de Wang et al. (2011), onde foi observado que a presença de POD está estreitamente ligada a defesa da planta ao patógeno, sendo considerada uma estratégia

importante para a planta quando a mesma possui ferimentos passíveis à infecção do patógeno.

## Conclusões

Contudo, conclui-se que a enzima Peroxidase tem um papel importante como mecanismo bioquímico de defesa da planta, aumentando significativamente seus níveis com a presença da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e que com o passar dos dias após o início do ataque da doença, ela trabalha efetivamente em busca do controle do patógeno.

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida;  
Aos meus pais, pela sabedoria em educar e ensinar os valores ideais;  
Ao NBA, pela oportunidade de trabalhar no desenvolvimento de pesquisas científicas;  
E ao CNPq pelo fomento dessas pesquisas;

## Referências

- BELASQUE, JR., J.; JESUS JR., W. C. Concentração de inoculo de métodos de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Laranja**, v. 27, p. 263-272, 2006.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus canker: The pathogen and its impact. **Online. Plant Health Progress** doi: 1094/PHP-2002-0812-01-RV. <http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/>. 2002.
- KARSTEN, J. Envolvimento da peroxidase e da polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae*). Viçosa: UFV, 2009. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)**, Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- SANTOS W. D.; FERRARESE M. L. L.; FINGER A.; TEIXEIRA A. C. N.; FERRARESE-FILHO O. Lignification and related enzymes in Glycine max root growth-inhibition by ferulic acid. **Journal of Chemical Ecology**. v.30, n.6, p.1203–212, 2004.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A. E AGARKOVA, I. V. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 690-695, 2006.
- WANG Y.; FU X.; LIU J.; HONG N. Differential structure and physiological response to canker challenge between 'Meiwa' kumquat and 'Newhall' navel orange with contrasting resistance. *Scientia Horticulturae*. v.128, p.115–23, 2011.
- NANAMI, D. S. Y. Avaliação de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis*) à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Tese (Doutorado em Agronomia)**, Universidade Estadual de Maringá, 2017.