

## CONTROLE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO EM FUNÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA DA PLANTA COM ÓLEOS FIXOS

Monica Sayuri Mizuno (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Kátia Regina de Freitas Schwan-Estrada (Orientador), e-mail: krfeestrada@uem.br.

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

### Área de ciências agrárias subárea em agronomia

**Palavras-chave:** *Alternaria solani*, indução de resistência, *Lycopersicon esculentum*

### Resumo:

O tomateiro está sujeito a várias doenças, dentre elas a Pinta Preta. Novas alternativas vêm sendo estudadas, sendo a indução de resistência um método potencial, que consiste em sensibilizar a planta a ativar seus mecanismos de defesa por um agente elicitador. Assim, foi estudada a ação utilizando o sinergismo entre óleos fixos. Dentre os tratamentos utilizados, não houve atividade das enzimas glucanase e fenilalanina, e houve atividade de peroxidase, polifenol e catalase e diminuição no teor de proteínas.

### Introdução

O tomateiro é uma das principais hortaliças de valor econômico mundial, estando sujeita a várias doenças, dentre uma delas é a Pinta Preta, causada pelo fungo *Alternaria solani* (Ellis & Martin) L.R Jones & Gront.

Novas alternativas de controle têm sido estudadas para promover a severidade de doenças em diversas culturas, sendo a indução de resistência um método potencial, que consiste em sensibilizar a planta a ativar seus mecanismos de defesa por um agente elicitador, preventivamente, preparando a planta para a chegada e tentativa de infecção e colonização de patógenos (CONRATH et al., 2002).

Dessa forma, o objetivo foi estudar a ação fungicida e indutora utilizando o sinergismo entre óleos de açaí, andiroba, buriti e copaíba.

### Materiais e métodos

Após o tomateiro atingir 5 folhas expandidas, a coleta foi iniciada, retirando folíolos do terço médio da planta. No dia seguinte, foi borrifado os tratamentos e, depois de 3 dias foram feitas outras coletas dos folíolos e inoculado o fungo *Alternaria solani*. A suspensão dos esporos foi realizada

com a contagem em câmara de Newbauer na concentração de  $1,5 \times 10^{-4}$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Após a inoculação, as plantas foram revestidas por 12 horas, em câmara úmida. Após 24 horas, foram realizadas outras coletas e posteriormente, aos 48 e 72 horas.

Os tratamentos utilizados foram açaí+andiroba (T2), açaí+buriti (T3), açaí+copaíba (T4), andiroba+buriti (T5), andiroba+copaíba (T6) e buriti+copaíba (T7) nas concentrações de 0,05%, contendo 4 repetições. Como controle utilizou-se água destilada (T1). Os óleos foram cedidos pelo laboratório de Química do solo da Universidade Federal do Acre.

Ao serem coletados, os folíolos foram pesados e armazenados em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) para posterior maceração com nitrogênio líquido. O extrato obtido foi centrifugado durante 30 minutos, retirado o sobrenadante e novamente armazenado para posterior análise enzimática.

#### *Determinação de proteínas totais*

Foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e 2,5 mL de reativo de Bradford. Após serem agitados em agitador, permaneceram encubados durante 5 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

#### *Determinação de catalase*

Para o teste, foram incubadas 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático em 0,5 mL de substrato para enzima contendo peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos. Posteriormente, foi acrescentado 0,5 mL de molibdato de amônio e realizado a determinação do consumo do peróxido de hidrogênio pela catalase presente no extrato, mensurado em espectrofotômetro a 405 nm. Para cada amostra, foi preparado o branco com a adição do molibdato de amônio à mistura de reação. Dessa forma, a diferença entre a absorbância do branco e a amostra incubada indicou a quantidade de peróxido de hidrogênio consumido pela enzima.

#### *Determinação de fenilalanina amônia-liase*

Para sua determinação, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, 400  $\mu\text{L}$  do Tampão TRIS-HCl (pH 8,8) e 500  $\mu\text{L}$  de L-fenilalanina (em Tampão TRIS-HCl, pH 8,8). Posteriormente, o mix de reação foi incubado a  $40^{\circ}\text{C}$  por uma hora e paralisado com 60  $\mu\text{L}$  de HCl. Sendo assim, sua absorbância foi determinada a 290 nm em espectrofotômetro.

#### *Determinação de peroxidase do guaiacol*

A determinação foi realizada pelo método do espectrômetro direto, pipetando 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 2,9 mL de substrato para a enzima, ao qual este foi preparado com 100  $\mu\text{L}$  de Guaiacol e 122,4  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio em 40 mL de Tampão peroxidase, mantidos a  $30^{\circ}\text{C}$ . A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm.

#### *Determinação de polifenoloxidase*

Determinação também realizada por espectrofotometria direta, com adição de 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e 900  $\mu\text{L}$  de substrato (12 mL de Tampão polifenol com 0,0264 g de Catecol, mantidos a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos).

#### *Determinação de glucanase*

Para a glucanase, foram preparados a Laminaria (8 mL de água destilada com 8 g de laminarina diluída e homogeneizada em agitador) e

PAHBAH (7 mL de HCl com 0,715 g de 4-Hydroxybenzhydrazide diluídos e homogeneizados, posteriormente acrescentado 28 mL de NaOH).

Foram realizadas as amostras, controles e o branco. Nas amostras foram pipetadas 150 µL do extrato enzimático e 150 µL de laminarina. Nos controles foram adicionados 150 µL de extrato enzimático e 150 µL de tampão de extração e no branco apenas 150 µL de laminarina e 150 µL de tampão de extração.

Os tubos foram mantidos durante 1 hora em banho maria a 40°C. Posteriormente, ao ser retirado do banho maria, foram adicionados 150 µL de laminarina no controle e então homogeneizados. Em seguida foram transferidos em outros tubos 30 µL de cada amostra e então levados novamente em banho maria à 100°C por 10 minutos. Ao serem retirados do banho maria, rapidamente foram transferidos em banho de gelo a 10 minutos para parar a reação e feito a leitura em espectrofotômetro a 410 nm.

Os resultados das leituras obtidas foram submetidos ao teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade e transformados em  $\arcsen((x/100)^{1/2})$  pelo programa estatístico SAMS-Agri.

## Resultados e Discussão

Houve apenas atividade de enzimas catalase, peroxidase e polifenol nas plantas de tomateiro, conforme Tabelas 1, 2, 3 e 4, sendo que, médias com mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As enzimas de fenilalanina e glucanase não apresentaram atividades.

**Tabela 1** – Atividade de proteínas em tomateiro utilizando óleos fixos em sinergismo.

Tratamentos	C1	0 h	24 h	48 h	72 h
T1	39,094 a	35,410 a	33,703 a	30,895 a	36,467 a
T2	74,277 a	27,305 b	40,674 b	28,312 b	32,390 b
T3	88,947 a	24,922 b	22,144 b	35,021 b	30,938 b
T4	93,947 a	24,623 b	13,064 b	24,943 b	21,372 b
T5	51,888 a	29,507 a	21,320 a	23,465 a	24,446 a
T6	99,199 a	19,381 b	25,949 b	20,684 b	21,459 b
T7	55,780 a	18,185 b	21,570 b	14,697 b	21,176 b

**Tabela 2** – Atividade de catalase em tomateiro utilizando óleos fixos em sinergismo.

Tratamentos	C1	0 h	24 h	48 h	72 h
T1	4,820 a	0,426 b	0,204 b	0,778 b	0,533 b
T2	2,261 a	0,511 b	0,524 b	0,529 b	0,732 b
T3	3,342 a	0,685 b	0,821 b	0,591 b	0,591 b
T4	3,475 a	0,630 c	1,534 b	0,601 c	1,167 b
T5	3,624 a	0,629 b	1,127 b	0,514 b	0,954 b
T6	3,246 a	0,994 b	0,763 b	0,654 b	1,115 b
T7	7,373 a	1,000 b	0,976 b	1,127 b	1,146 b

**Tabela 3** – Atividade de peroxidase em tomateiro utilizando óleos fixos em sinergismo.

Tratamentos	C1	0 h	24 h	48 h	72 h
T1	3,824 a	5,572 a	11,554 a	4,846 a	7,198 a
T2	1,170 b	7,766 a	8,892 a	5,024 a	11,190 a
T3	0,942 b	9,464 a	23,429 a	5,082 b	17,764 a
T4	0,720 c	9,022 b	46,716 a	5,190 b	9,692 b
T5	1,402 b	12,274 a	23,575 a	4,944 b	19,716 a
T6	0,670 a	26,103 a	24,302 a	5,097 a	22,504 a
T7	2,329 b	12,918 b	18,603 a	5,104 b	33,299 a

**Tabela 4** – Atividade de polifenol em tomateiro utilizando óleos fixos em sinergismo.

Tratamentos	C1	0 h	24 h	48 h	72 h
T1	3,241 a	1,311 b	1,976 b	4,225 a	2,632 a
T2	1,292 b	2,186 b	1,876 b	4,019 a	3,379 a
T3	1,415 a	2,690 a	3,659 a	3,952 a	2,541 a
T4	1,253 b	3,740 a	5,627 a	3,933 a	5,470 a
T5	2,130 b	2,937 b	4,754 a	4,697 a	4,082 a
T6	1,113 b	3,629 a	3,453 a	5,653 a	5,888 a
T7	2,424 b	4,363 b	4,499 b	9,395 a	5,889 a

## Conclusões

De acordo com os dados obtidos, houve inibição no teor de proteínas após aplicação dos tratamentos sinérgicos de T2, T3, T4, T6 e T7 e da atividade da enzima catalase com os tratamentos T2, T3, T5, T6 e T7 pois na coleta sem aplicação houve leituras maiores nos teores de mg proteína  $gpf^{-1}$  (proteína) e  $\mu mol\ min^{-1}\ mg\ prote\acute{a}na^{-1}$  (catalase). Para as atividades de peroxidase e polifenol houve maiores respostas nos tratamentos T2, T3, T4, T5 e T7 e T2, T4, T5, T6 e T7, respectivamente.

## Agradecimentos

A autora expressa seus agradecimentos ao CNPq a Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica concedida através do Programa Institucional de Bolsa PIBIC/CNPq-FA-UEM.

## Referências

- ELLIS, J. B., MARTIN, G. B. *Macrosporium solani*. American Nature, Washington, v. 10, p. 1003, 1882.
- CONRATH, U., PIETERSE, C.M.J. & MAUCH-MANI, B. **Priming in plant pathogen interactions**. Trends in Plant Science 7:210-216. 2002.