

Alterações nas concentrações de proteínas e fenóis em cultivares de melão resistente e suscetível a *Myrothecium roridum*

Gaus Silvestre de Andrade LIMA¹; Sônia Maria Alves de OLIVEIRA²; Egídio BEZERRA NETO³; Jaime Halisson B. SILVA⁴; Maria MENEZES²

RESUMO: Avaliou-se a resposta de seis cultivares de melão ao fungo *Myrothecium roridum*, bem como as alterações nos níveis de proteínas solúveis e compostos fenólicos em cultivares com diferentes níveis de resistência. Analisaram-se tecidos saudios, infectados e injuriados mecanicamente, aos 0, 2, 4 e 6 dias após a inoculação com o patógeno. As cultivares Amarelo Ouro e Pingo de Mel comportaram-se como as mais suscetíveis, enquanto a cultivar Imperial foi a mais resistente. As concentrações de proteínas e fenóis aumentaram significativamente, ao longo do tempo, nos tecidos infectados das cultivares resistente e suscetível, no entanto, na cultivar resistente esse aumento ocorreu mais depressa. Essas observações podem explicar o maior nível de resistência da cultivar Imperial.

Palavras chave: *Cucumis melo*, *Myrothecium roridum*, compostos fenólicos e protéicos.

INTRODUÇÃO

O fungo *Myrothecium roridum* Tode ex Fries já foi relatado parasitando diversos hospedeiros de pelo menos 20 famílias botânicas, incluindo culturas importantes como soja, algodão, café, tomate, melão, além de diversas ornamentais (Nguyen, Mathur & Neergard, 1973; Chase, 1983; Kuti, Ng & Bean, 1987). Sua importância pode variar profundamente, dependendo das condições ambientes, do hospedeiro e do isolado considerado (Chase & Poole, 1984; Taneja, Raj & Seth, 1990). Alguns autores o consideram como um patógeno oportunista, capaz de infectar apenas plantas previamente feridas ou sob condições altamente favoráveis ao seu desenvolvimento (Chase, 1982; Chase & Poole, 1984). Outros no entanto, o apontam como um patógeno de potencial devastador (McLean & Sleeth, 1961). Bruton (1982) relatou perdas de até 30% na cultura do melão (*Cucumis melo* L.).

Alguns trabalhos têm relatado fontes de resistência a este fitopatógeno (Kuti, Ng & Bean, 1987; Silva, Menezes & Oliveira, 1993), no entanto tais estudos não abordam as formas pelas quais cultivares com diferentes níveis de resistência respondem à infecção. Por outro lado, o envolvimento de fenóis, proteínas e diversos outros compostos produzidos pela planta na resposta ao ataque de patógenos tem sido relatado para diversos patossistemas (O'Connell *et al.*, 1990; Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Pascholati, 1995). Assim, o presente trabalho teve como objetivos verificar a reação de seis cultivares de melão a *M. roridum* e acompanhar as alterações nas concentrações de proteínas solúveis e compostos fenólicos, em cultivares com diferentes níveis de resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo, inoculação e avaliação da resistência

O isolado de *M. roridum* foi obtido de meloeiros provenientes de Mossoró-RN, apresentando lesões nas hastes. Plantas das cultivares Amarelo Ouro, Caipira, El Dorado, Imperial, Pingo de Mel e Valenciano foram inoculadas quando da emissão da quinta folha verdadeira, através da deposição de um disco de BDA contendo as estruturas do patógeno, no colo da planta previamente ferido. Para evitar a desidratação do inóculo, as plantas foram mantidas em câmara úmida coletiva por 36 horas. A avaliação da severidade dos sintomas foi realizada 10 dias após a inoculação, baseando-se numa escala de notas variando de 0 a 4, sendo a nota 0 atribuída às plantas que não apresentavam sintomas e a nota 4 às plantas apresentando lesões que atingiam mais de 75% do diâmetro da haste ou às plantas mortas (Tabela 1).

Tabela 1- Escala de notas para determinar a severidade dos sintomas de *Myrothecium roridum* em plantas de meloeiro

Nota	Comportamento	Classificação
0	Ausência de sintomas	Altamente resistente
1	Lesões atingindo até 25% do diâmetro da haste	Resistente
2	Lesões atingindo entre 26 a 50% do diâmetro da haste	Medianamente resistente
3	Lesões atingindo entre 51 e 75% do diâmetro da haste	Suscetível
4	Lesões atingindo mais de 75% do diâmetro da haste ou planta morta	Altamente suscetível

Determinação de proteínas solúveis e compostos fenólicos - Como mencionado a seguir, as cultivares Pingo de Mel e Imperial foram as mais suscetíveis e resistente, respectivamente. Portanto, foram escolhidas para se determinar como os níveis de proteínas solúveis e compostos fenólicos se comportam em cultivares com diferentes níveis de

¹ Aluno do Mestrado em Fitossanidade da UFRPE. Dois Irmãos, 52171-900 - Recife-PE

² Prof.^a Adjunto do Departamento de Agronomia/Fitossanidade/UFRPE.

³ Prof. Adjunto do Departamento de Química/UFRPE.

⁴ Bolsista de IC do Departamento de Química/UFRPE.

resistência. Para isso, a intervalos regulares de 0, 2, 4 e 6 dias após a inoculação, amostras de tecidos sadios e doentes foram extraídas das hastas conforme descrito por Bach *et al.* (1992). Visando-se determinar se o ferimento feito na ocasião da inoculação provoca alterações nos níveis desses compostos, tecidos injuriados mecanicamente também foram analisados como descrito a seguir.

Proteínas solúveis totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Alíquota de 0,1mL da amostra foram acrescentados a 5mL do reagente "coomassie brilliant blue" e as leituras realizadas após dois minutos e antes de uma hora, em espectrofotômetro, a 595nm e comparadas com a curva padrão de albumina de soro bovino. Para cada amostra, realizaram-se três repetições experimentais e duas repetições analíticas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para determinação do conteúdo de compostos fenólicos, alíquotas de 150µL dos extratos vegetais foram acrescentadas de 3mL de carbonato de sódio a 2%. Após cinco minutos adicionou-se às amostras, sob constante agitação, 150µL de uma solução do reagente de Fôlin-Ciocalteau 2 N diluído em água destilada (1:1 v/v) (Bray & Thorpe, 1954). A concentração de fenóis de cada amostra foi determinada utilizando-se uma curva padrão de diferentes concentrações de ácido gálico. As leituras foram efetuadas a 750nm, 30 minutos após a adição do reagente. Para cada amostra realizaram-se três repetições experimentais e duas analíticas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Figura 1, as cultivares Amarelo Ouro e Pingo de Mel foram as mais suscetíveis a *M. roridum*, tanto que, sete dias após a inoculação todas as plantas encontravam-se mortas. A cultivar Imperial por sua vez apresentou-se como a mais resistente. As demais cultivares apresentaram-se como intermediárias. Kutí, Ng & Bean (1987) também verificaram a maior resistência da cultivar Imperial em relação a cultivar Amarelo Ouro. Na ocasião os autores avaliaram o comportamento de 50 genótipos de melão em relação a *M. roridum*, verificando que a cultivar Hales Best apresentou a maior resistência.

A concentração de proteínas solúveis diminuiu, com o decorrer do tempo, nos tecidos sadios das duas cultivares estudadas. Essa redução foi um pouco maior na cultivar Pingo de Mel, porém não houve diferença estatística entre as cultivares. Com relação aos tecidos infectados, constatou-se um aumento na

concentração desses compostos, sendo que para a cultivar Imperial tal aumento foi significativo já partir do quarto dia após a inoculação, enquanto que para a cultivar Pingo de Mel isso só ocorreu no sexto dia (Figura 2). Não houve diferença significativa entre os tecidos sadios e os tecidos injuriados mecanicamente. Esses dados divergem dos relatos de Lima *et al.* (1995), que observaram um acúmulo de proteínas ao longo do tempo, para os tecidos sadios, injuriados ou inoculados com *Botryodiplodia theobromae* em hipocótilos estiolados de melão.

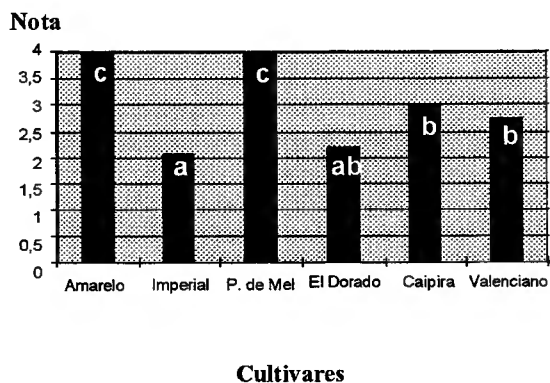


Figura 1 - Resposta das cultivares de melão inoculadas com *M. roridum*. Nota 0 = ausência de sintomas; nota 4 = lesões maiores que 75 % do diâmetro da haste ou planta morta.

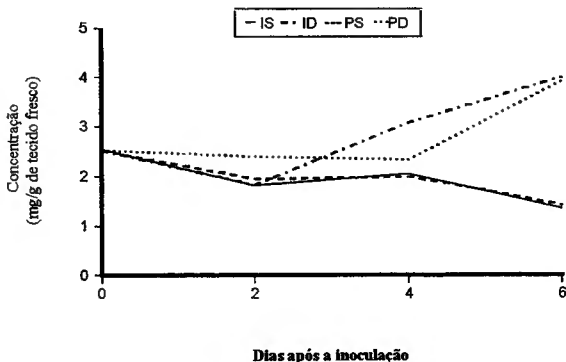


Figura 2 - Alterações na concentração de proteínas solúveis nas cultivares Pingo de Mel (suscetível) e Imperial (resistente), ao longo do tempo. IS = Imperial sadia; PS = Pingo de Mel sadia; ID = Imperial doente; PD = Pingo de Mel doente.

O aumento no conteúdo de proteínas nos tecidos infectados pode ser consequência da síntese de enzimas que participam da resistência como peroxidases, quitinases, β -1,3 glucanases, proteases, fenoloxidase, entre outras (Boller, 1987; Kuc, 1990), ou ainda por enzimas produzidas pelo patógeno, que podem atuar na degradação de material da parede celular ou do citoplasma, ou na neutralização da defesa da planta (Pascholati, 1995). Neste sentido, Hammershimidt, Nucle & Kuc (1982) verificaram

que a inoculação de folhas de pepino (*Cucumis sativus*) com *Colletotrichum lagenarium* provoca um aumento na atividade de peroxidases. Tal fato leva à ativação de resposta sistêmica do hospedeiro e conseqüente aumento da resistência contra uma inoculação posterior.

Ainda com relação ao pepino, Zhang & Punja (1990) observaram a indução de isoformas de quitinases após a inoculação de fungos patogênicos (*Sphaerotheca fuliginea* e *C. lagenarium*) ou não (*C. lindemuthianum*), após o tratamento com elicitores químicos (quitosan e ácido salicílico) ou em resposta à injúria mecânica. As maiores concentrações foram verificadas três dias depois dos tratamentos e os extratos de tecidos de pepino contendo quitinases mostraram atividade antifúngica *in vitro* contra a germinação de esporos de *Thielaviopsis basicola* e o crescimento micelial de *Trichoderma* sp. O'Connell *et al.* (1989) relataram a acumulação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina nas paredes adjacentes às células mortas pela resposta hipersensitiva durante a resistência de plantas de melão a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* e *P. fluorescens*.

Com relação aos compostos fenólicos, verificou-se que suas concentrações permaneceram praticamente constantes, para as duas cultivares, considerando-se os tecidos saudios. Todavia quando avaliou-se os tecidos doentes, verificou-se que nestes havia um aumento significativo, tanto na cultivar Imperial como na Pingo de Mel (Figura 3). Na cultivar Imperial a acumulação dos compostos deu-se mais rapidamente, contudo, dessa vez, não houve diferença significativa. A exemplo do que ocorreu com as proteínas, não se observou diferenças entre os tecidos saudios e injuriados. Aumentos na concentração de fenóis também foram relatados por Lima *et al.* (1995), em hipocótilos estiolados de meloeiros inoculados com *B. theobromae*. No entanto, para Nicholson & Hammerschmidt (1992), embora participem da defesa de várias plantas contra patógenos, nem sempre os compostos fenólicos determinam a resistência do hospedeiro. Além disso, muitas vezes o acúmulo de compostos fenólicos é uma conseqüência da infecção e não uma reação de resistência.

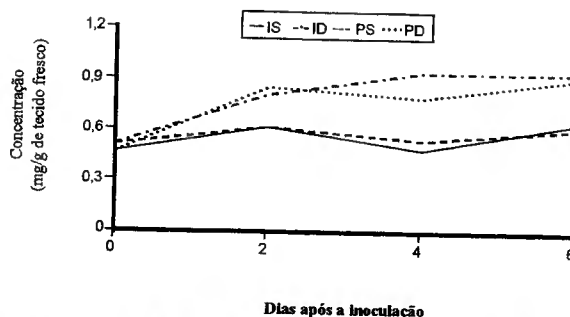


Figura 3 - Alterações na concentração de compostos fenólicos nas cultivares Pingo de Mel (suscetível) e Imperial (resistente), ao longo do tempo. IS = Imperial sadia; PS = Pingo de Mel sadia; ID = Imperial doente; PD = Pingo de Mel doente.

Mecanismos estruturais de resistência também já foram relatados para o meloeiro. Por exemplo, Cohen, Eyal & Hanania (1990), verificaram que cultivares resistentes ao oídio (*S. fuliginea*) apresentaram deposição de calose e lignina mais rápidas e intensas que as cultivares suscetíveis. De acordo com Kuc & Preisig (1984) a lignificação gera um ambiente hostil para o patógeno, isto é, toxidez de fenóis precursores de ligninas, toxidez de radicais livres, lignificação de suas estruturas e aumento na resistência de polissacarídeos e proteínas da parede celular à degradação por enzimas do patógeno.

De acordo com Ghosh & Purkayastha (1992) o tratamento de folhas de soja com extratos de paredes celulares de hifas de *M. roridum*, bem como outros elicitores de origem biótica ou abiótica resultou na acumulação de gliceolina, uma fitoalexina do grupo dos fenóis, e conseqüentemente no aumento da resistência do hospedeiro contra inoculações posteriores com o mesmo fitopatógeno. Pascholati *et al.* (1986) conseguiram induzir resistência em melão contra *Mycosphaerella melonis* após a inoculação com um fungo não patogênico (*Helminthosporium carbonum*) ou com uma suspensão de esporos autoclavada do patógeno, entretanto, não determinaram os mecanismos envolvidos nessa resposta.

Dessa forma, o acúmulo mais rápido de proteínas e/ou fenóis apresentado pela cultivar Imperial pode estar relacionado com sua maior resistência em relação à cultivar Pingo de Mel. Para Kuc (1995), a regulação da expressão de genes que codificam produtos que contribuem para a defesa é que vai determinar a resistência, uma vez que tanto plantas resistentes como suscetíveis podem produzir compostos de defesa. Ainda de acordo com o mesmo autor, a velocidade, intensidade e a escolha de diferentes elementos da resposta e a atividade do produto do gene, influenciada pelo ambiente interno e externo da planta é que vão determinar a resistência ou a suscetibilidade.

ABSTRACT

Alterations in protein and phenol concentration on resistance and susceptibility of melon cultivars to *Myrothecium roridum*

The response of the six melon cultivars to *Myrothecium roridum* and the changes in soluble protein and phenolic compound concentration in cultivars with different resistance levels were available. Health, infected and mechanically damaged tissues were evaluated at 0, 2, 4, and 6 days after inoculation. 'Amarelo Ouro' and 'Pingo de Mel' were the most susceptible cultivars, in contrast to 'Imperial' which showed the highest resistance level. Protein concentration increased in the infected tissues but decreased in the health and damaged tissues in both cultivars. In general, phenolic compound levels remained constant in the health and damaged tissues but increased in the infected tissues of both cultivars.

Key words: *Cucumis melo*, *Myrothecium roridum*, phenols, proteins compound.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BACH, E.E. et al. Biochemical changes in *Pennisetum purpureum* leaves infected with *Exserohilum turcicum*. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.19, p.93-95, 1993.
- 2 BOLLER, T. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: KOSUGUE, T.; NESTER, E.W. (Ed.) *Plant microbe interactions, molecular and genetic perspective*. New York: MacMillan, 1987. v.2, p.385-413.
- 3 BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- 4 BRAY, H.G.; THORPE, W.V. Analysis of phenols compounds of interest in metabolism. *Methods of Biochemical Analysis*, New York, v. 27, p.155-157, 1954.
- 5 BRUTON, B.D. *Myrothecium roridum*, a potentially devastating pathogen of muskmelon in south Texas. *Phytopathology*, St. Paul, v.72, p.355, 1982.
- 6 CHASE, A.R. Influence of host plant and isolate source on *Myrothecium* leaf spot of foliage plants. *Plant Disease*, St. Paul, v.67, p.252-258, 1983.
- 7 CHASE, A.R.; POOLE, R.T. Development leaf spot of *Dieffenbachia maculata* "Perfection" at various temperatures. *Plant Disease*, St. Paul, v.68, p.448-490, 1984.
- 8 COHEN, Y.; EYAL, H.; HANANIA, J. Ultrastructure, autofluorescence, callose deposition and lignification in susceptible and resistant muskmelon leaves infected with the powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v.36, p.191-204, 1990.
- 9 GHOSH, S.; PURKAYASTHA, R.P. Elicitation of glyceollin by natural products and metallic salts. *International Journal of Tropical Plant Diseases*, New Delhi, v.10, p.99-108, 1992.
- 10 HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, London, v.20, p.73-82, 1982.
- 11 KUC, J.; PREISIG, C. Fungal Regulation of disease resistance mechanism in plants. *Mycologia*, Bronx, v.76, p.767-784, 1984.
- 12 KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.33, p.275-297, 1995.
- 13 KUTI, J.O.; NG, T.J.; BEAN, G.A. Reactions of muskmelon cultivars to *Myrothecium roridum*. *Hortsciense*, Alexandria, v.22, p.635-637, 1987.
- 14 LIMA, N.F.; PINHEIRO, D.M.; SANT'ANA, E.G.; LOPEZ, A.M.Q. Biochemical aspects of the resistance callus and hypocotyls (*Cucumis melo* L.) against phytopathogens. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 24., 1995, Caxambu. *Resumos...* Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1995. p.58.
- 15 McLEAN, D.M.; SLEETH, B. *Myrothecium* rind rot of cataloupe. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, v.45, p.728-729, 1961.
- 16 NGUYEN, T.H.; MATHUR, S.B.; NEERGARD, P. Seed-borne species of *Myrothecium* and their pathogenic potential. *Transaction of British Mycological Society*, v.61, p.347-354, 1973.
- 17 NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, v.30, p.369-383, 1992.
- 18 O'CONNELL, R.J.O. et al. Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins accumulating in melon and bean at sites of resistance to bacteria and fungi. *Molecular Plant-microbe Interactions*, v.3, p.33-40, 1990.
- 19 PASCHOLATI, S.F.; MORAES, W.B.C.; FIGUEREDO, M.B.; OLIVEIRA, A.R. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculations with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.11, p.507-514, 1986.
- 20 PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: Arsenal enzimático In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*, São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.343-364.
- 21 PRESTON, N.C. Observations on the genus *Myrothecium* II. *Myrothecium gramineum* Lib. and two new species. *Transaction of British Mycological Society*, v.31, p.271-276, 1947.
- 22 SILVA, D.; MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A. Reação de genótipos de melão a *Myrothecium roridum*, em Pernambuco. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.19, p.42, 1993. (Resumos).
- 23 TANEJA, N.K.; RAJ, S.; SETH, P.K. Existence of pathotypes in *Myrothecium roridum*. *Indian Phytopathology*, New Delhi, v.43, p.464-466, 1990.
- 24 ZANGH, Y.; PUNJA, Z.K. Induction and characterization of chitinases isoforms in cucumber (*Cucumis sativus* L.): effect of elicitors, wounding and pathogen inoculation. *Plant Science*, Limerick, v.99, p.141-150, 1994.