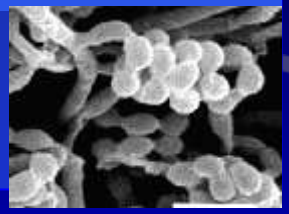
Efeito da fitotoxina taxtomina A sobre sementes e plântulas de rabanete

Fitotoxinas:

Sarna Comum

S. scabies



Concanamicinas

Taxtominas

S. acidiscabies
S. tugidiscabies

entre outras

Taxtominas

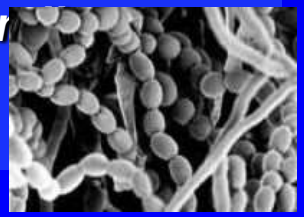
Taxtominas

...

Sarna ferruginosa

S. cheloniun

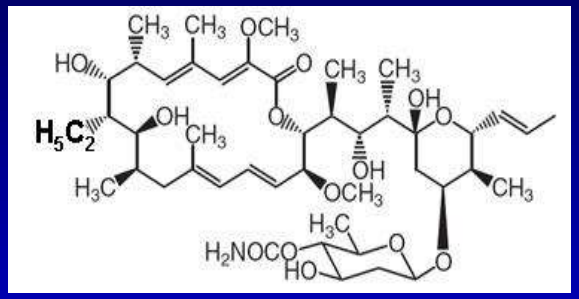
entre outras



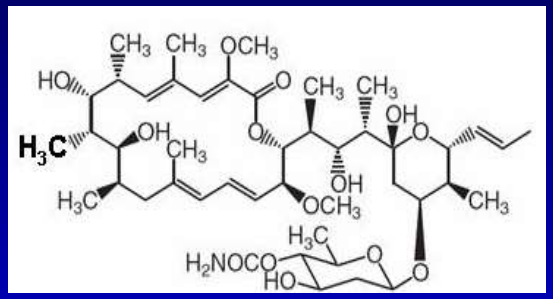
FD-891

(Loria et al., 2001);

Concanamicinas



Concanamicina A



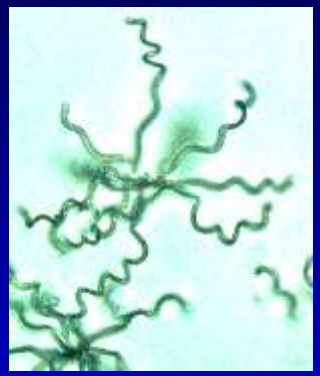
Concanamicina B

Mecanismo de ação :

→ Inibição da ATPase em estruturas ou organelas membranosas, como os vacúolos (HUSS et al., 2002).

→ Influência na agressividade dos isolados de *S. scabies* ? (HUSS et al., 2002; NATSUNAME et al., 2005).

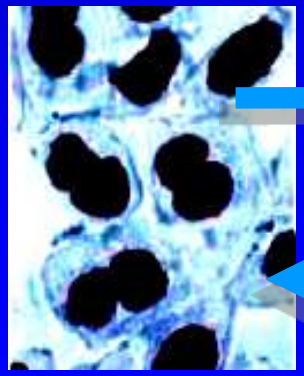
Taxtomina A



(*Tegg et al.*, 2005).

Mecanismo de ação:

- → Bloqueio da **biossíntese de celulose**
- → Alterações no fluxo de **Ca^{2+}** e **H^{+}** na membrana plasmática
- → **Morte celular** programada

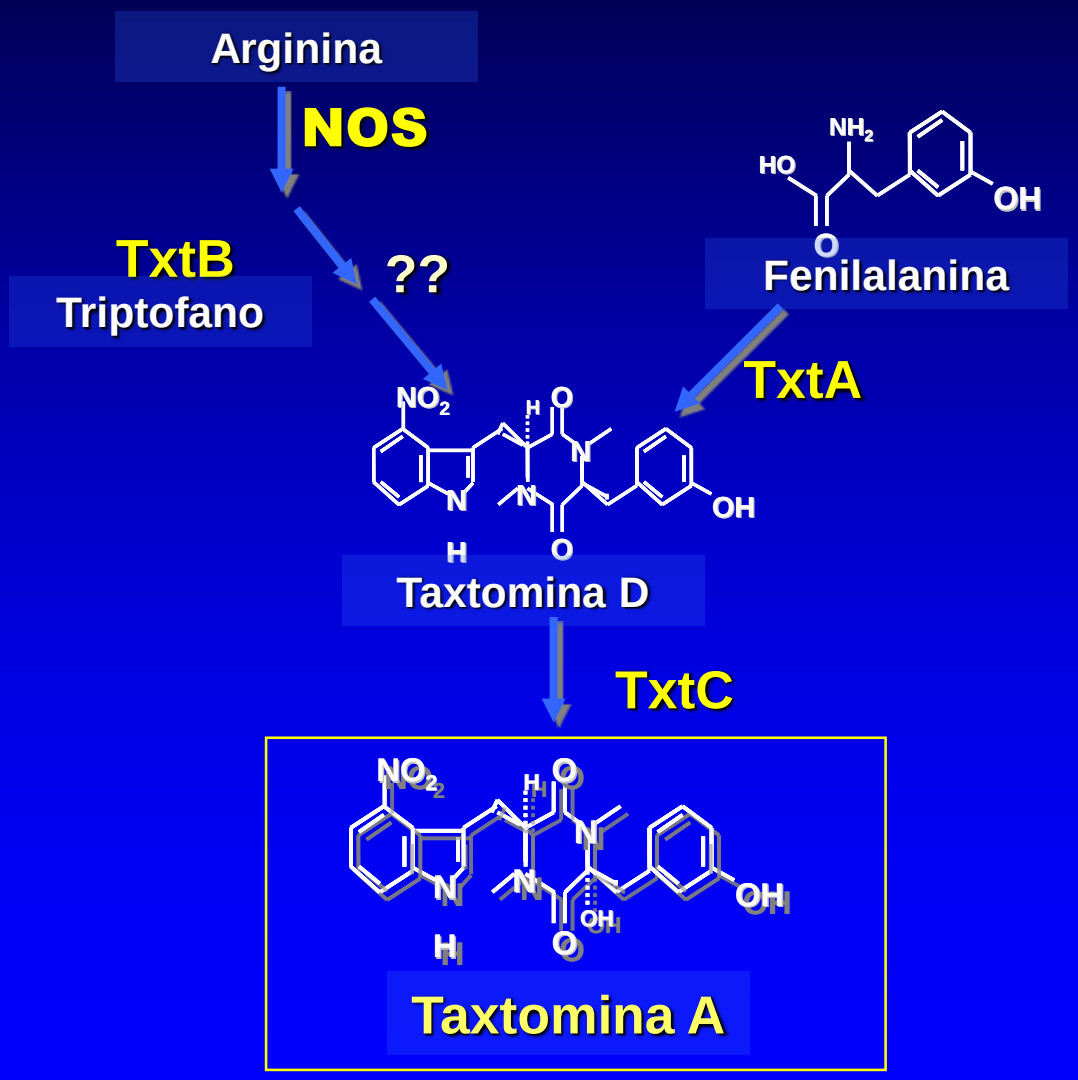


Ca^{2+}

H^{+}

(*Duval et al.*, 2005; *Scheible et al.* 2003)

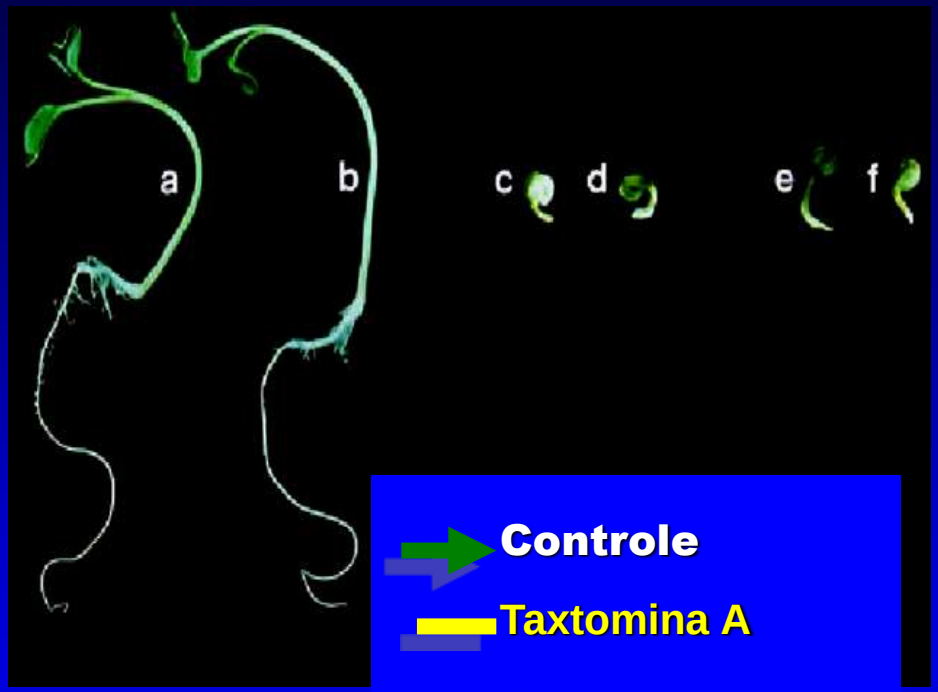
Taxtomina A: Biossíntese não-ribossomal



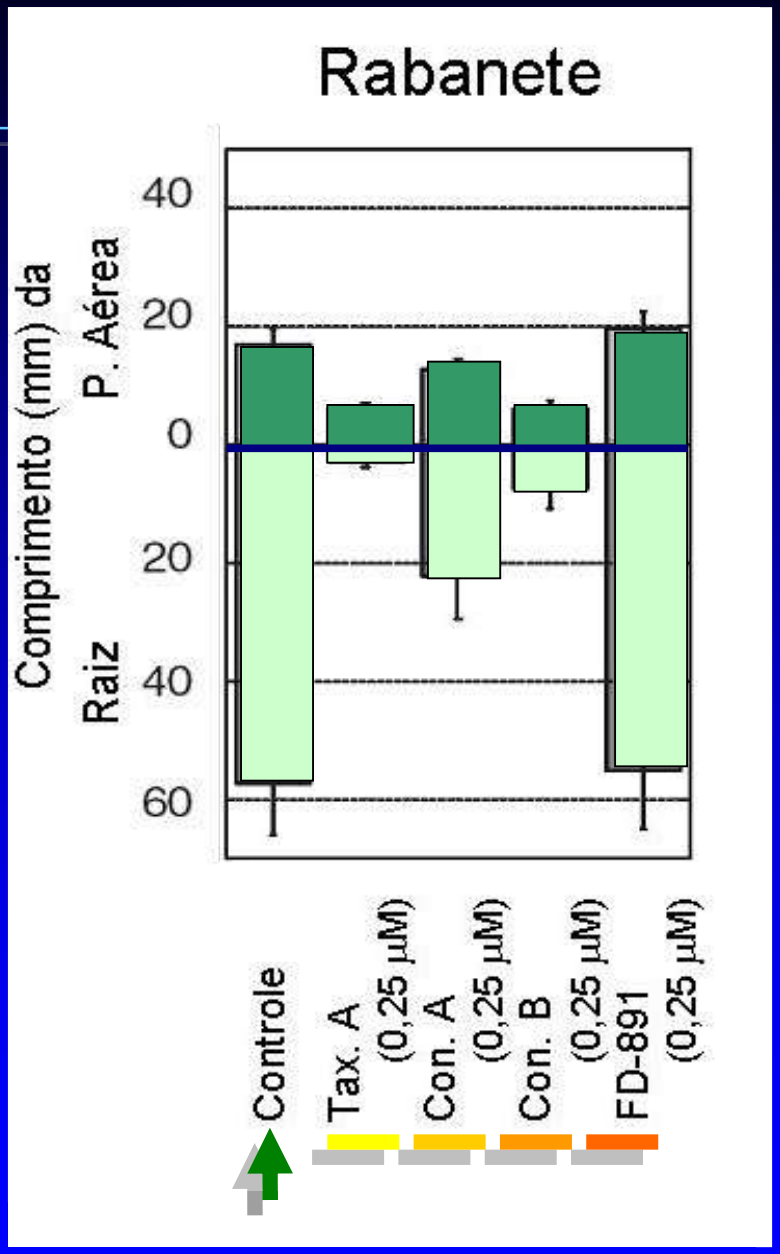
Ação enzimática

(Adaptado: Loria et al., 2008)

Fitotoxinas

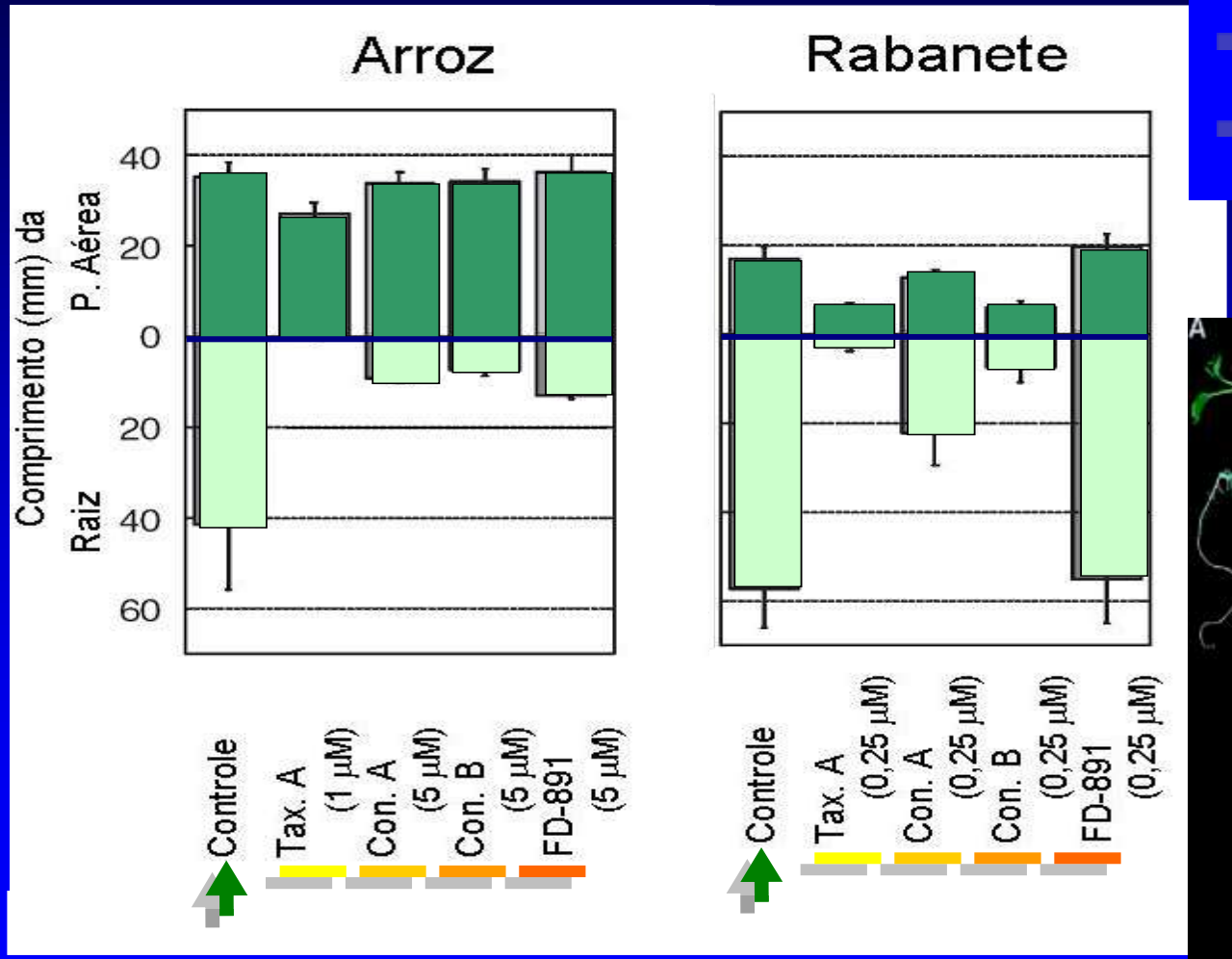


- Controle
- Taxtomina A
- Concanamicina A
- Concanamicina B
- FD-891

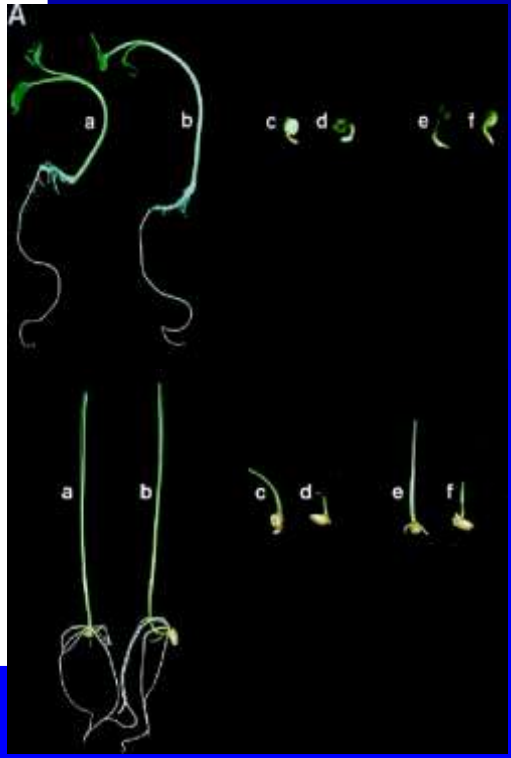


(Natsume et al., 2005)

Fitotoxinas



- Controle
- Taxtomina A
- Concanamicina A
- Concanamicina B
- FD-891



Natsume et al 2005.

Toxinas: Extração

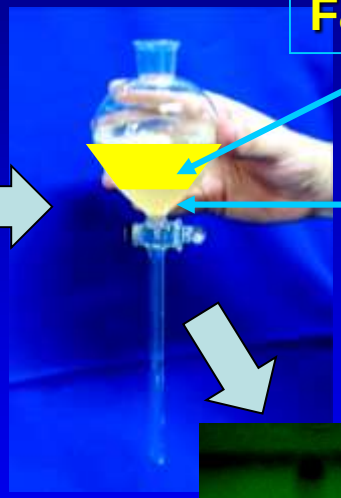
Cultura liquida
4 dias

3 discos
Agitação 150 rpm
28ºC

Placa com 30 dias

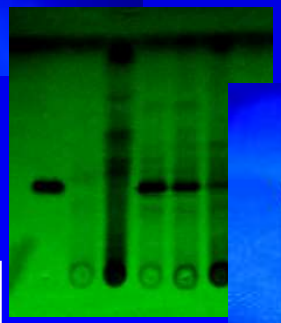
Filtração

Funil de separação



Fase orgânica

Fase aquosa



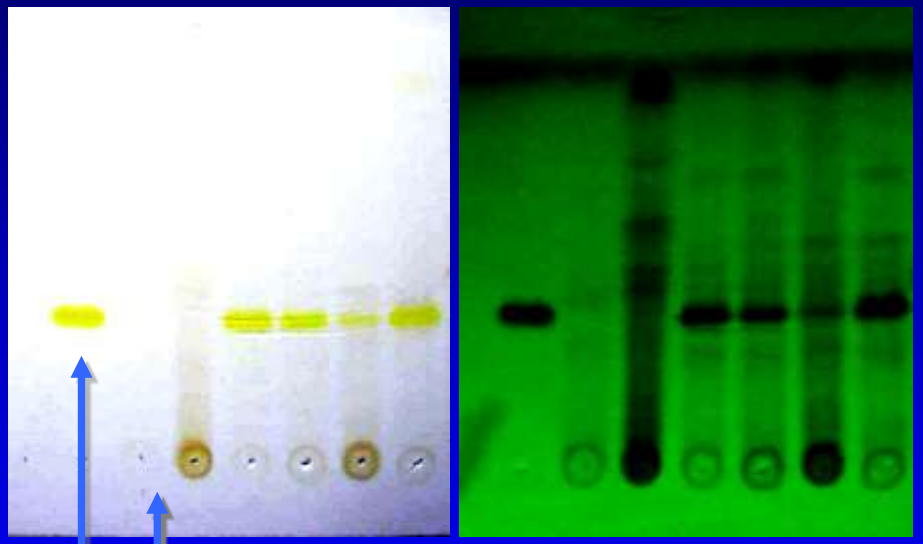
T.LC.

Taxtomina A

(Adaptado: Loria et al, 2001)

Toxinas: Identificação

TLC – *Thin layer chromatography*



254 nm

Controle
(Extrato do meio)

Taxtomina A

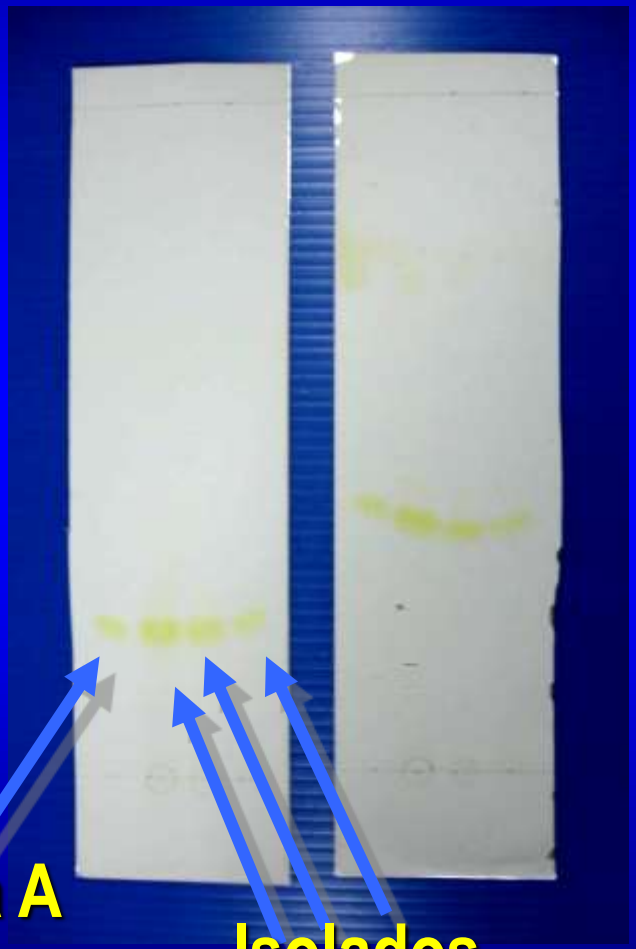
Tabela - Produção de taxtomina A por isolados de *Streptomyces* spp., utilizados no ensaio de seleção dos isolados com base no nível de produção de fitotoxinas

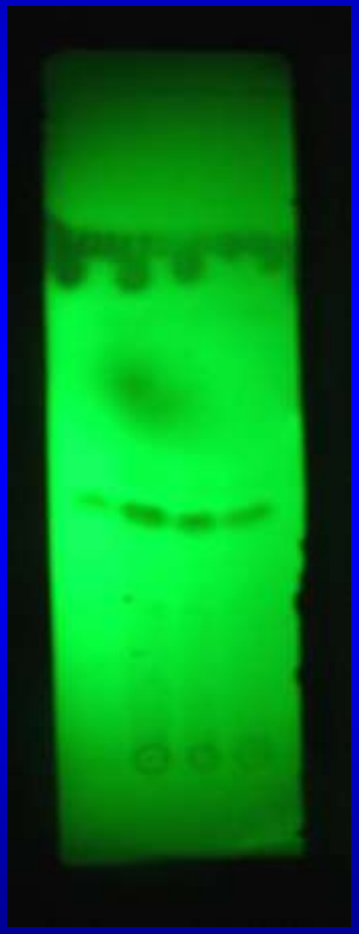
Isolado (n° IBSBF)	Produção de taxtomina A:
2472	+
2499	+
2509	-
2147	+
2501	+
2502	+
2524	+
2503	+
2500	+
2507	+

* +) produz; -) não produz

Taxtomina A : Identificação

TLC





Taxtomina A purificada

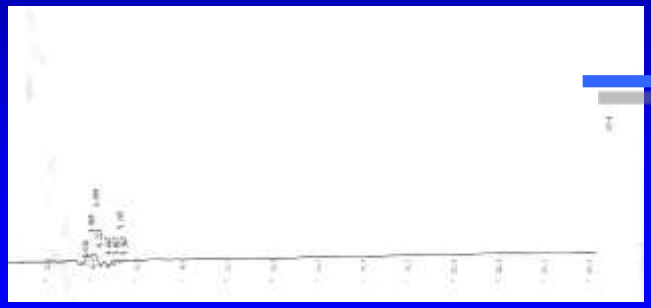
Isolados

Taxtomina A : produção

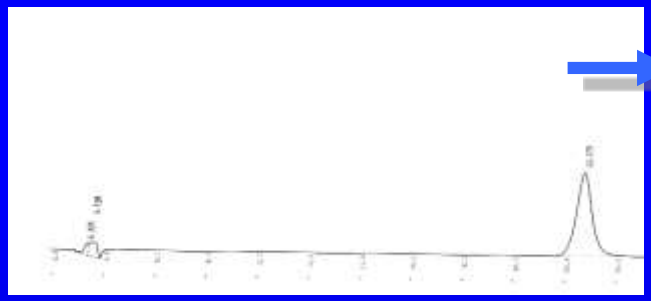
Cultivo em meio líquido (pH 7,2) → 4 dias, 28°C → **Extração** c/ acetato de etila → **Leitura em HPLC** (λ=380nm)

King *et al.*, 1992

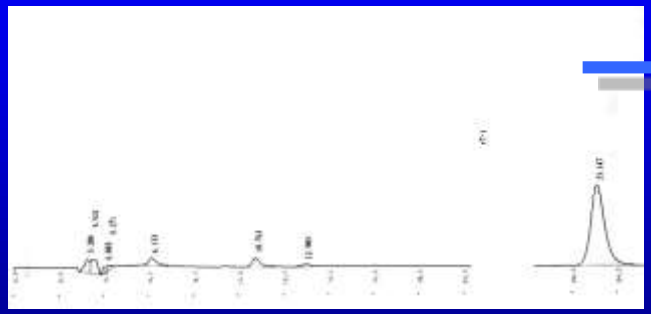
Taxtomina A : quantificação



Metanol (controle)



Taxtomina A purificada (50µg/mL)



Isolado 21 (Holanda)

Tempo de retenção médio:

22,8 min

Toxinas: Quantificação - HPLC

Tabela: Quantificação das fitotoxinas

Isolado *Streptomyces* spp. (IBSBF)	µg toxina / mL meio			
	Concanamicinas			Taxtomina A
	A	B	A + B	
2501	5,3	9,1	**14,4 a***	**17,7 a**
2502	1,0	4,9	5,9 **c**	**18,4 a**
2124	1,1	4,1	5,2 **cd**	14,5 **b**
2172	0,6	1,3	1,9 **de**	13,8 **b**
2503	0,3	1,9	2,2 **de**	12,1 **bc**
2147	1,1	2,3	3,4 **d**	7,5 **c**
2507	0,1	0,3	**0,4 e**	**18,1 a**
2500	2,6	5,9	8,5 **b**	4,7 **d**
2499	1,1	1,6	2,7 **de**	2,3 **de**
2159	Nd **	Nd	Nd	Nd
C.V. (%)			13,17	12,5

← **1.** Produtor de altos das níveis concanaminas

← **2. Pouco** produtor desta toxina

Seleção de isolados

Comparação: métodos

Isolados

Toxina

Monalisa | Cupido | Ágata | Asterix | Mondial | Atlantic

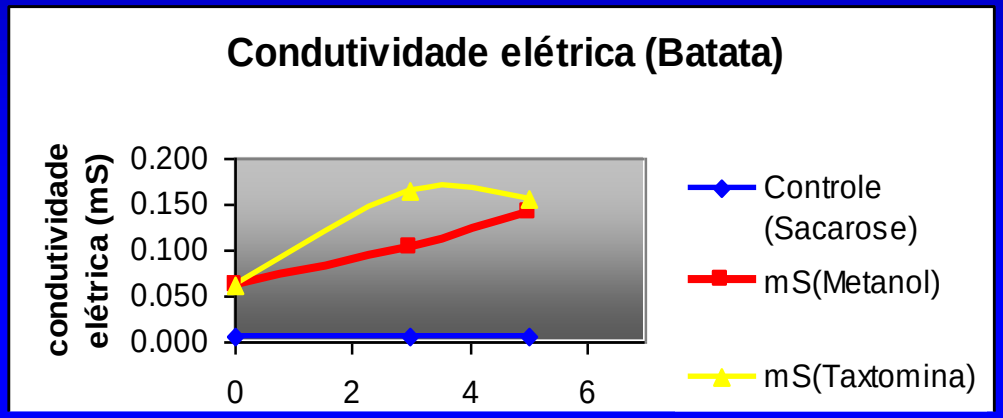
Resistentes

Condutividade elétrica

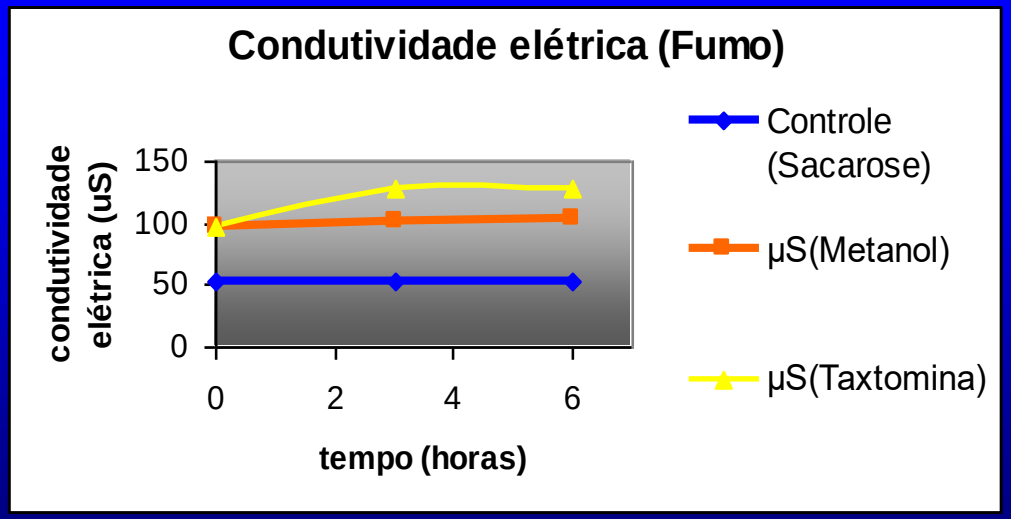
- ✓ 1 g de tecido + sol. sacarose 0,1 M;
- ✓ 10 min (estabilizar);
- ✓ Avaliação por 6 horas (2-2 h).

Condutividade eléltrica

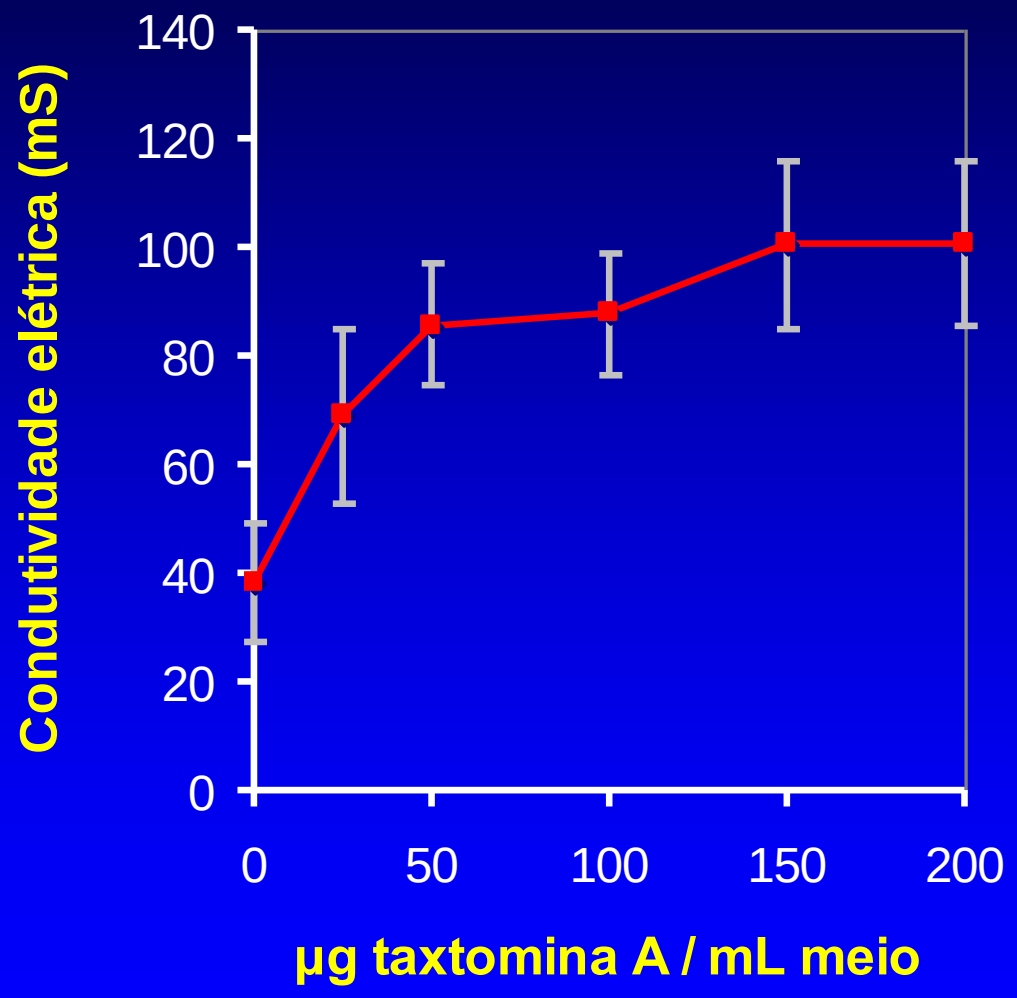
Batata

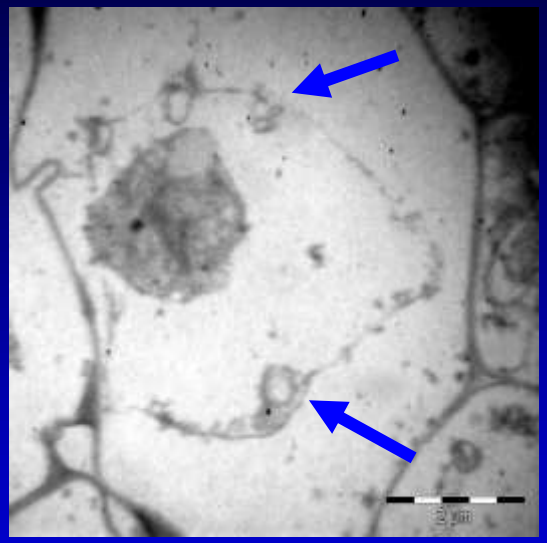


Fumo



Taxtomina A: Permeabilidade seletiva da MP





Evidências:

AM-toxina e **AK-toxina** *(PARK et al. 1976; PARK 1978).*

amilovorina *(GOODMAN, 1972; HUANG & GOODMAN, 1976),*

fusicoccina (*HANCHEY, 1981*),

vitorina (*HANCHEY et al., 1968*).

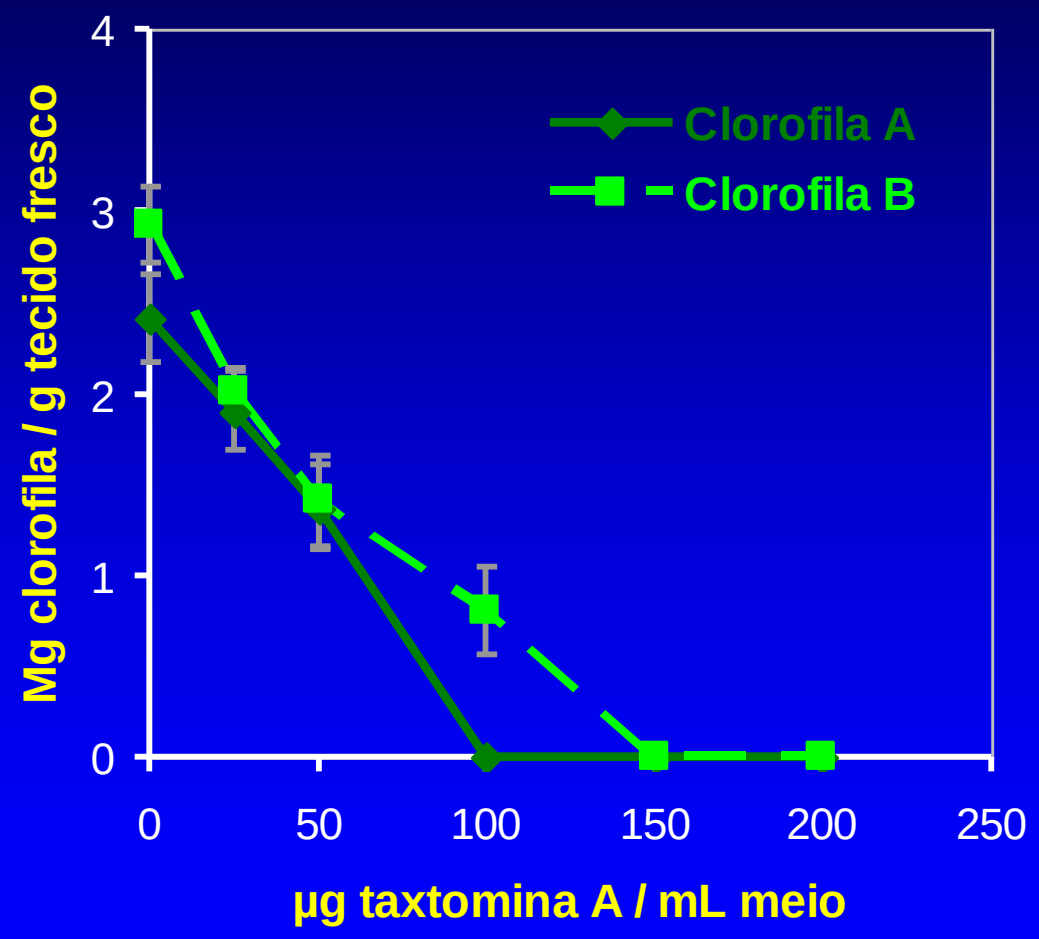
Clorofilas A e B

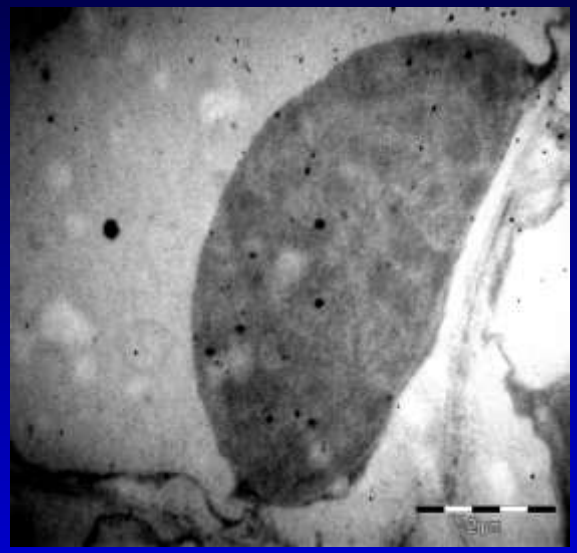
Acetona 70%

Meio (contr.)

*µg taxtomina A

Clorofilas A e B





Evidências:

Tabtoxina : ***Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em folhas de fumo**

(*HUANG & GOODMAN, 1976*).

Experimento - Efeito da fitotoxina taxtomina A sobre sementes e plântulas de rabanete

Produção da toxina:

Cultivar o isolado em meio de aveia por quatro dias (pode ser no escuro ou sob luz). Meio aveia - Ferver 30 g de aveia prensada por 20 min., peneirar, completar o volume para 1 litro, ajustar o pH para 7,2 com NaOH 0,1 M e autoclavar.

Extração:

- Separar as células do sobrenadante por meio de filtração em papel;
- Transferir um volume do sobrenadante para um funil de separação;
- Adicionar um volume e meio de acetato de etila;
- Recolher a fase orgânica;
- Desidratar adicionando sulfato de sódio anidro (este sal não é solúvel em acetato de etila e permanecerá no fundo do recipiente);
- Evaporar o acetato de etila em rotoevaporador ou sob corrente de ar;
- Suspender a preparação de toxina em 3 ml de metanol.

Bioensaio para metabólitos tóxicos em plântulas de rabanete

- Pré-germinar sementes de rabanete por 24 h sobre papel de filtro umedecido;
- Transferir três plântulas de rabanete para tubos contendo ágar água 0,8 %, previamente autoclavados;
- Adicionar, sobre as plântulas, três gotas ($\pm$ 40 μl cada gota) de preparação de toxina, usando pipeta Pasteur. Usar metanol e água destilada como controles;
- Incubar as plântulas sob luz por três dias e observar os sintomas: plântulas tratadas com a fitotoxina apresentam sintomas de inanição contrastando com as plântulas tratadas com metanol.