

Enzimas Associadas à Indução de Resistência em Morangueiro pelo Uso de Quitosana e Acibenzolar-S-Metil

Enzymes Associated with Resistance Induction in Strawberry Plants by Chitosan and Acibenzolar-S-Methyl Application

Sérgio Miguel Mazaro

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Dois Vizinhos, PR
sergio@utfpr.edu.br

Alfredo de Gouvea

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Dois Vizinhos, PR
alfredo@utfpr.edu.br

Américo Wagner Junior

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Dois Vizinhos, PR
americo@utfpr.edu.br

Idemir Citadin

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Pato Branco, PR
idemir@utfpr.edu.br

Resumo: Estudos relacionados à utilização de indutores de resistência de plantas a patógenos têm apresentado grande importância, considerando a demanda por frutos mais saudáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de enzimas associadas à indução de resistência em morangueiro pelo uso de quitosana e Acibenzolar-S-Metil (ASM). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com 16 plantas por parcela e cinco repetições. Os tratamentos foram quitosana (1,0%); ASM (0,0025%), aplicação dos fungicidas tiofanato-metílico (0,0049%), iprodione (0,0075%) e folpete (0,00135%) e a testemunha (água destilada). A aplicação dos tratamentos ocorreu 45 dias após o plantio das mudas de morangueiro cv. Aroma e amostras foliares foram

Recebido em 10/06/2012 - Aceito em 27/08/2012.

RECEN 14(1) p. 91-99 jan/jun 2012 DOI: 10.5777/RECEN.2012.01.06

coletadas 24, 72, 120 e 168 h após a aplicação dos mesmos. As PRs-proteínas quitinase e β -1,3-glucanase são ativadas pelo uso dos indutores, sendo a β -1,3-glucanase pronunciada nas primeiras 120 horas após a aplicação dos indutores e a quitinase a partir de 168 horas da indução.

Palavras-chave: ASM; BTH; fragaria x ananassa; pr-proteínas.

Abstract: Studies related to the use of inductors of plant resistance to pathogens have shown great importance, specially considering the demand for healthy fruits. The aim of this work was to evaluate the enzymes activity associated with resistance induction in strawberry plants by chitosan and Acibenzolar-S-Methyl (ASM) application. The experiment was designed in completely randomized blocks, with 16 plant by plot and five replications. The chitosan (1.0%), ASM (0.0025%), fungicides application tiofanato-metílico (0,0049%), iprodione (0,0075%) e folpete (0,00135%) and distilled water were the treatments tested. The treatments were applied 45 days after that the strawberry plants from variety Aroma were planted. It was collected leaf samples 24, 72, 120 and 168 hours after the treatments applications. The quitinase and β -1,3-glucanase PRs-proteins are activated by the use inductors, being the activity of β -1,3-glucanase great during the first 120 hours and quitinase after 168 hours of inductors application.

Key words: ASM; BTH; fragaria x ananassa; pr-proteins.

1 Introdução

A proteção natural das plantas está baseada em uma série de barreiras pré-formadas e pós-formadas [1]. Os fatores de resistência pré-formados são aqueles presentes na planta antes do contato com o patógeno. Já os pós-formados, estão ausentes ou em baixo nível antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou

repelentes ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta [2].

Essas defesas podem ser ativadas pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética. Essas moléculas capazes de ativar respostas de defesas nas plantas, são chamadas de elicitores, atuando como indutores de resistência [3]. Os elicitores podem induzir a resistência local adquirida (RLA), a resistência sistêmica induzida (RSI) ou a resistência sistêmica adquirida (RSA) [4].

A indução de resistência ou Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) pode ser conceituada como mecanismo de defesa induzida por agentes bióticos ou abióticos, que confere proteção à planta, a um amplo espectro de microorganismos [5].

Plantas expostas ao agente indutor de resistência apresentam aumento na atividade de rotas metabólicas quando envolvidas na percepção da presença de patógenos em potencial, permitindo a sinalização bioquímica a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado e, por consequência, aumento nas atividades de enzimas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos, tais como PR-Proteínas [6].

Nesse sentido, algumas enzimas têm sido consideradas como indicadoras do estado de indução, dentre as quais, citam-se as enzimas líticas quitinases e β -1,3-glucanases sendo, de forma genérica, chamadas de PR-proteínas.

Essas enzimas têm recebido progressiva atenção como importantes componentes do arsenal de proteínas de defesa das plantas, catalisando a hidrólise dos principais carboidratos da parede celular dos fungos: quitina e beta 1,3-glucano [7].

Dentre os agentes que possuem propriedades ativadoras de mecanismos de defesa em plantas encontra-se a quitosana, sendo este um indutor abiótico orgânico, obtido a partir da reação de desacetilação parcial da quitina, substância esta que é encontrada em crustáceos, insetos, moluscos e na parede celular de fungos [8].

A quitosana atua na RSA com ativação da rota do ácido salicílico e na ativação de proteínas relacionadas à patogenicidade [9], como a quitinase e β -1,3-glucanase [10, 11].

Outro agente indutor da RSA, amplamente utilizado, é o composto sintético acibenzolar-S-metil (ASM), que é análogo do ácido salicílico [4, 12] e também atua no acúmulo de PRs-proteínas, como a quitinase e β -1,3-glucanase [13].

Porém, por mais que se conheçam os efeitos indutores de quitosana e ASM no meio científico, trabalhos que busquem avaliar a atividade de enzimas associadas à indução de resistência em morangueiro são limitados.

Com isso, a confirmação da ativação das PR-proteínas permitirá desenvolver estratégias de controle para ativação da defesa em morangueiro, bem como, servir de base para estudo em diferentes patossistemas, servindo de referência para outras pesquisas, considerando-se a inoculação de patógenos, cultivares, sistemas de cultivo, concentrações e frequência de aplicação dos indutores.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de enzimas relacionadas à patogenicidade, associadas à indução de resistência em morangueiro pelo uso de quitosana e ASM.

2 Materiais e métodos

O trabalho foi conduzido no ano de 2005, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Dois Vizinhos – PR, com coordenadas geográficas de 25°42'52" S e 53°03'94" O, a 519 metros acima do nível do mar. O solo local é o tipo Latossolo Vermelho Distroférico Típico e o terreno apresenta em torno de 3% de declividade média.

Foi utilizada a cultivar de morangueiro Aroma, plantada no mês de maio, em espaçamento de 30x30cm. O sistema de condução foi em túnel baixo com fertirrigação com duas fileiras de tubos gotejadores e com sistema de *mulching* plástico.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com 16 plantas por parcela e cinco repetições. Foram avaliados como tratamentos quitosana 1,0%; ASM (0,0025%) produto Bion 500WG[®], aplicação de fungicidas recomendados para a cultura (tiofanato-metílico - 49g i.a./100L/água; iprodione - 75g i.a./100L/água e folpete - 135g i.a./100L/água) e testemunha a base de água destilada.

A aplicação dos tratamentos ocorreu 45 dias após o plantio, sendo as amostras foliares coletadas 24, 72, 120 e 168 h após a aplicação. As amostras de tecidos vegetais foram armazenadas em nitrogênio líquido até suas avaliações. As análises foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo – Piracicaba, onde se determinou atividade de

quitinase e β -1,3-glucanase.

Para dosagem das atividades de quitinase e β -1,3-glucanase, as amostras foram maceradas em 4,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4°C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para a determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase, nos extratos, foi utilizado, como substrato, solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg/ml, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth & Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo & Martins [14].

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

3 Resultados e discussão

Os indutores quitosana e ASM ativaram as proteínas-RPs, sendo as β -1,3-glucanases pronunciada nas primeiras 120 horas após a aplicação de quitosana, com sua atividade acrescida em 680%, 294% e 370% nas avaliações de 24, 72 e 120 horas, respectivamente, em comparação com a testemunha. Para o ASM, a atividade das β -1,3-glucanases foi mais expressiva com 120 horas, em comparação com os valores obtidos após 24 horas da aplicação dos indutores. A atividade das quitinases foi pronunciada a partir de 168 horas da indução, sendo seus valores acrescidos em 340% e 230%, para quitosana e ASM, respectivamente, em comparação com os valores obtidos após 24 horas da aplicação dos indutores (Tabela 1).

Entre as proteínas-RPs mais pesquisadas estão as β -1,3-glucanases e as quitinases, com atividade antimicrobiana hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos, sendo expressadas na RSA, associadas à cascata de sinais do ácido salicílico, o qual é o sinalizador para a expressão dessas proteínas relacionadas à patogenicidade [15].

Em pesquisa realizada por Costa et al. [16], os níveis mais altos de atividade de quitinases e β -1,3-glucanases, em raízes de videira, ocorreu quatro dias após a inocu-

lação de *F. oxysporum f. sp. herbemontis*. Os autores consideraram que, do momento da indução até o quarto dia, ocorreu ativação de genes de defesa, síntese e acúmulo máximo das enzimas nos tecidos radiculares. Estas Proteínas-PR são acumuladas no apoplasto das células vegetais, localização que permite a defesa contra o ataque de patógenos e que gera sinais moleculares capazes de ativar respostas de defesa no interior da célula [17]. Também em tomateiros o acúmulo de Proteínas-PR, ocorreu entre três e cinco dias após a indução por *Pseudomonas fluorescens* e *Fusarium oxysporum*, o que indica ter havido reação de defesa da planta [18].

Tabela 1. Atividade enzimática de quitinase ($UAbs/min^{-1}/mg\ prote\acute{a}na^{-1}$) e β -1,3 Glucanase ($UAbs/min^{-1}/mg\ prote\acute{a}na^{-1}$) presentes nos extratos foliares de plantas de morangueiro da cultivar Aroma não tratadas e em plantas tratadas com elicitores e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2005

| Tratamentos | Avaliações Bioquímicas enzimáticas | | | | |
|--|------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 24 horas | 72 horas | 120 horas | 168 horas | Média |
| Atividade de B-1,3 Glicanase ($Uabs/min^{-1}/mg\ prote\acute{a}na^{-1}$) | | | | | |
| Testemunha | $2,8 \cdot 10^{-4}$ c | $7,5 \cdot 10^{-4}$ b | $6,9 \cdot 10^{-4}$ b | $14,0 \cdot 10^{-4}$ a | $7,8 \cdot 10^{-4}$ c |
| Fungicidas | $3,4 \cdot 10^{-4}$ c | $4,6 \cdot 10^{-4}$ b | $27,0 \cdot 10^{-4}$ a | $12,0 \cdot 10^{-4}$ a | $11,0 \cdot 10^{-4}$ b |
| ASM | $10,2 \cdot 10^{-4}$ b | $14,5 \cdot 10^{-4}$ a | $25,0 \cdot 10^{-4}$ a | $13,0 \cdot 10^{-4}$ a | $15,0 \cdot 10^{-4}$ a |
| Quitosana 1,0% | $19,1 \cdot 10^{-4}$ a | $12,1 \cdot 10^{-4}$ a | $25,9 \cdot 10^{-4}$ a | $17,0 \cdot 10^{-4}$ a | $18,0 \cdot 10^{-4}$ a |
| C.V. | 15,48 | 14,5 | 12,64 | 19,82 | 15,12 |
| Atividade de quitinases ($UAbs/min^{-1}/mg\ prote\acute{a}na^{-1}$) | | | | | |
| Testemunha | $11,0 \cdot 10^{-4}$ a | $8,9 \cdot 10^{-4}$ a | $6,4 \cdot 10^{-4}$ a | $7,6 \cdot 10^{-4}$ c | $8,4 \cdot 10^{-4}$ b |
| Fungicidas | $14,0 \cdot 10^{-4}$ a | $6,6 \cdot 10^{-4}$ a | $6,6 \cdot 10^{-4}$ a | $6,1 \cdot 10^{-4}$ c | $8,3 \cdot 10^{-4}$ b |
| ASM | $14,0 \cdot 10^{-4}$ a | $8,7 \cdot 10^{-4}$ a | $6,7 \cdot 10^{-4}$ a | $33,0 \cdot 10^{-4}$ b | $15,6 \cdot 10^{-4}$ a |
| Quitosana 1,0% | $12,0 \cdot 10^{-4}$ a | $7,7 \cdot 10^{-4}$ a | $7,2 \cdot 10^{-4}$ a | $41,0 \cdot 10^{-4}$ a | $16,9 \cdot 10^{-4}$ a |
| C.V. | 26,94 | 30,89 | 55,65 | 21,55 | 32,26 |

*Comparação das médias na coluna pelo de Tukey em nível de 5% de $p > 0,05$ de erro

Já em plantas de tomateiro pulverizadas com ASM, houve aumento significativo na atividade de quitinases em folhas logo à primeira hora após a pulverização, em relação ao controle. Essa diferença permaneceu relativamente constante até 48 horas após a aplicação. A atividade da mesma enzima também foi medida entre 3 e 12 dias após a aplicação e não diferiu das plantas-controle [19].

Esse comportamento diferenciado entre as espécies é previsível, pois o metabo-

lismo é diferenciado entre as plantas e indutores utilizados. Nesse sentido, esse trabalho permitiu observar que plantas de morangueiro, quando induzidas por quitosana e ASM, têm suas rotas metabólicas ativadas para produção de quitinases e, posteriormente, para β -1,3, glucanase.

O tratamento com fungicidas também induziu a formação de PRs-proteínas β -1,3-glucanase, na avaliação de 120 horas após a aplicação dos tratamentos (Tabela 1). Isso possivelmente se deve ao fato de os fungicidas empregados possuírem, além de atividade antifúngica, algum efeito de indução de resistência. Esse efeito indutor de fungicidas já foi observado em trabalho desenvolvido por Antoniazzi [20], no qual se verificaram alterações em PRs-proteínas com o uso de fungicidas no tratamento de cevada.

4 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os indutores quitosana e Acibenzolar-S-Metil são capazes de atuar na resistência sistêmica adquirida em morangueiro, ativando as PRs-proteínas β -1,3-glucanase e quitinase.

5 Referências

- [1] TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Tradução: SANTAREM et al., 3^a ed., Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.
- [2] PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 2, p. 1-51, 1994.
- [3] STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, v. 35, p. 235-270, 1997.
- [4] TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review, *Postharvest Biol Tec*, v. 32, p. 1-13, 2004.
- [5] DURRANT, W.E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. *Annu Rev Phytopathol*, v. 42, p. 185-209, 2004.

- [6] MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C. LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano, *Summa Phytopathol*, v. 34, n. 1, p. 34-37, 2008.
- [7] CAMPOS, A.D.; HAMPE, M.M.V.; FERREIRA, A.G.; ANTUNES, I.F.; CASTRO, L.A.S. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Pesqui Agropecu Bras*, v. 44, n. 1, p. 15-21, 2009.
- [8] DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesqui Agropecu Bras*, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.
- [9] SATHIYABAMA, M., BALASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Prot*, v.17, p.307-313, 1998.
- [10] EL GHAOUTH, A., ARUAL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, v.82, p.398-402, 1992.
- [11] RODRIGUES, A.A.C.; NETO, E.B.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.492-499, 2006.
- [12] GALDEANO, D.; GUZZO, S.D.; PATRÍCIO, F.R.A.; HARAKAVA, R. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. *Pesqui Agropecu Bras*, v.45, n.7, p.686-692, 2010.
- [13] INBAR, M.; DOOSTDAR, H.; SONODA, R.M.; LEIBEE, G.L.; MAYER, R.T. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. *J Chem Ecol*, v.24, p.135-149, 1998.

- [14] GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *J Pathol*, v.144, p.449-454, 1996.
- [15] GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, v.43, p.205-227, 2005.
- [16] COSTA, M.D; LOVATO, P.E.; SETE, P.B. Micorrização e indução de quitinases e β -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. *Pesqui Agropecu Bras*, v.45, n.4, p.376-383, 2010.
- [17] LEBEDA, A.; LUHOVÁ, L.; SEDLÁROVÁ, M.; JANCOVÁ, D. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions: review. *J Plant Dis Protect*, v.108, p.89-111, 2001.
- [18] RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with f. sp. *lycopersici*. *Plant Soil*, v.239, p.55-68, 2002.
- [19] CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; COSTA, J.C.B.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. *Pesqui Agropecu Bras*, v.41, n.12, p.1721-1730, 2006.
- [20] ANTONIAZZI, N. Desenvolvimento de cevada em resposta ao uso de elicitores para controle de *Bipolaris sorokiniana*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2005.