

Artigo Científico

Resumo

O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento de sementes com o indutor de resistência quitosana sobre o tombamento de plântulas de *Eucalyptus saligna*, relacionando-os com a ação bioquímica e a resposta de defesa vegetal. O experimento foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos – PR, no ano de 2011. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo a unidade experimental composta por 25 sementes. Os tratamentos aplicados nas sementes foram as concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% de quitosana, na testemunha utilizou-se somente imersão em água destilada. Posteriormente as sementes tratadas foram semeadas em tubetes contendo o substrato inoculado com o fungo *Rhizoctonia solani* e mantidas em estufa por um período de 28 dias até a avaliação. Avaliou-se a porcentagem de germinação, índice de velocidade de emergência, porcentagem de tombamento de pós-emergência (damping-off), comprimento radicular, altura e massa da matéria fresca. As variáveis bioquímicas avaliadas foram: teor de proteínas, fenóis e a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). O tratamento das sementes de eucalipto com o uso de quitosana apresentou resultados favoráveis para índice de velocidade de emergência e maior comprimento radicular, entretanto, deve-se resguardar procedimentos em determinadas faixas de concentração que possam ser fitotóxicas. Ainda, as análises bioquímicas demonstraram expressiva atividade da enzima FAL, indicando que houve ativação do metabolismo de defesa vegetal pelo uso de quitosana.

Palavras-chave: fitopatologia; *Rhizoctonia solani*; *Eucalyptus saligna*.

Inducción de resistencia al tumbado de plántulas de eucalipto por tratamiento de semillas con quitosano

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del tratamiento de la semilla con el indutor de resistencia quitosano sobre el tombamiento de plántulas de *Eucalyptus saligna*, relacionándolos con la acción bioquímica y respuesta de la defensa vegetal. El experimento se llevó a cabo en la Universidad Tecnológica Federal de Paraná - Campus Dois Vizinhos - PR, en el año 2011. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones y la unidad experimental consistió de 25 semillas. Se aplicaron tratamientos a las semillas en la forma de concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0 y 2,0 % de quitosano, y el testigo se utilizó solamente inmersión en agua destilada. Posteriormente se sembraron las semillas tratadas en tubetes conteniendo sustrato inoculado con el hongo *Rhizoctonia solani*, manteniendo estas semillas en invernadero durante un período de 28 días hasta la evaluación. Se evaluó el porcentaje de germinación, índice de velocidad de emergencia, el porcentaje de tombamiento de plántulas en post-emergencia, longitud de la raíz, altura y masa de la materia fresca. Las variables bioquímicas evaluadas fueron: contenido de proteínas, fenóles y la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liase (PAL). El tratamiento de semillas de eucalipto con el uso de quitosano mostró resultados favorables para la velocidad de emergencia y mayor longitud de la raíz, sin embargo, se debe salvaguardar los procedimientos en ciertos intervalos de concentración que pueden ser fitotóxicos. Además, los análisis mostraron expresiva actividad de la enzima FAL, lo que indica que hubo una activación del metabolismo de defensa de la planta por el uso de quitosano.

Palabras clave: Patología Vegetal; *Rhizoctonia solani*; *Eucalyptus saligna*.

Introdução

O tombamento de mudas, as podridões

radiculares, as ferrugens e as manchas foliares estão entre as doenças que mais comumente acometem as mudas em viveiros florestais (WENDLING et al., 2002).

Recebido em: 25/02/2012.

Aceito em: 02/08/2012.

1 Engenheiro Florestal, M.Sc., Professor do Curso de Agronomia da Faculdade Educacional de Dois Vizinhos (FAED/UNISEP), Dois Vizinhos, PR, Brasil. Rua Prudente de Moraes, 1369. CEP 85660-000, e-mail: alvaro@unisep.edu.br.

2 Engenheiro Agrônomo, Dr., Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Dois Vizinhos, PR, Brasil.

3 Engenheiro Florestal, Dr., Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Dois Vizinhos, PR, Brasil.

Dentre os agentes causais mais comuns do tombamento de mudas estão os fungos dos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora* (BEDENDO, 2011). De acordo com WENDLING et al. (2002), o tombamento de mudas ou *damping-off* é a doença mais comum em viveiros florestais, a qual é causada por fungos que atacam o colo das mudas originadas de sementes nos estádios iniciais de germinação, a qual pode em poucos dias ocasionar a morte das plântulas.

A utilização de medidas de controle contra agentes causadores de *damping-off*, estão principalmente relacionadas com a redução do inoculo do patógeno, a promoção do rápido desenvolvimento da plântula e com o controle de condições ambientais favoráveis ao patógeno (BEDENDO, 2011).

Dentre as medidas preventivas para o controle deste tipo de doença em viveiros florestais, estão as seguintes: escolha adequada do local de instalação do viveiro; desinfestação do solo com fungicidas; tratamento das sementes com produtos registrados para este fim; escolha do substrato e utilização de material de cobertura (WENDLING et al., 2002).

A utilização de fungicidas é uma das principais medidas para o controle de patógenos causadores de tombamento de plântulas, entretanto, de acordo com SCHWAN-ESTRADA et al. (2000), a utilização destes produtos tem efeito positivo a curto prazo, contudo a longo prazo os efeitos podem ser negativos, através do surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas e também através dos resíduos destas substâncias, que podem causar danos ao meio ambiente e para a sociedade como um todo através do seu potencial poluidor.

Produtos naturais vêm sendo estudados e utilizados no controle de doenças de plantas, dentre estes está a quitosana, a qual de acordo com AZEVEDO et al. (2007), trata-se de um amino polissacarídeo, derivado da desacetilação da quitina, que constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular dos fungos, sendo considerada após a celulose, como composto orgânico mais importante da natureza.

A quitosana por ser um produto natural, geralmente de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos (AZEVEDO et al., 2007) e de acordo com ARYA (2010) pode ser uma alternativa a pesticidas sintéticos na indução de resistência a doenças. Ainda, de acordo com DI PIERO e GARDA (2008) a utilização

da quitosana na agricultura pode trazer benefícios socioeconômicos e ambientais, ao utilizar o resíduo das indústrias pesqueiras.

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o efeito da utilização do tratamento de sementes de *Eucalyptus saligna* com diferentes doses de quitosana, na indução de resistência ao tombamento de mudas causado por *Rhizoctonia solani*.

Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitossanidade e Bioquímica e no Viveiro Florestal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Dois Vizinhos/PR. O Campus está localizado na Comunidade de São Cristóvão, do município de Dois Vizinhos, sudoeste do Paraná, as coordenadas UTM do local são 7155400 sul e 289451 leste e altitude média de 557 metros.

Os tratamentos aplicados às sementes envolveram concentrações de quitosana em água destilada (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%) e a testemunha (apenas água destilada). A quitosana foi dissolvida em ácido acético a 1%, seguindo diluição com água destilada para obter as concentrações a serem testadas.

A quitosana utilizada no experimento, era proveniente de farmácia de manipulação, sendo considerado produto puro, proveniente de carapaça de crustáceos, destinada a uso medicinal.

As sementes de *Eucalyptus saligna* utilizadas no experimento são provenientes de matrizes do município de Dois Vizinhos/PR. Estas foram imersas na solução de quitosana por 5 segundos e então, semeadas em tubetes contendo o substrato infestado com micélio de *R. solani*.

O substrato utilizado foi o composto PLANTMAX®, com a seguinte composição média: 60% de casca de *Pinus*; 15% de vermiculita de granulometria “fina” e 15% de granulometria “superfina”; e 10% de húmus. O substrato utilizado foi esterilizado em autoclave por 1 hora a 120°C, e então inoculado com *R. solani*.

Os inóculos do patógeno foram preparados a partir de isolados de *R. solani* do Laboratório de Fitossanidade, de onde se obteve culturas puras desenvolvidas em placas de Petri de 11 cm de diâmetro contendo meio de BDA (batata 200 g, dextrose 20 g, agar 20 g e água destilada 1.000 mL), mantidas em estufa incubadora tipo B.O.D. a 23±1°C e fotoperíodo de 12 horas. Discos dessa cultura pura foram inoculados em sementes de sorgo

auto-clavadas e então mantidos em condições que favorecessem o crescimento micelial.

Essas sementes de sorgo contaminadas com *R. solani* foram utilizadas como veículo infestante ao substrato esterilizado. Utilizou-se sementes de sorgo, pois estas se apresentaram de forma adequada para produzir o micélio do patógeno e para serem misturadas de forma homogênea no substrato.

Os tubetes foram enchidos com substrato agora misturado de forma homogênea com o veículo infestante (sementes de sorgo com micélio de *R. solani*) e colocados em estufa do Viveiro Florestal. As unidades experimentais do experimento foram constituídas por 25 tubetes. Cada tubete recebeu uma semente de *E. saligna* tratada com as suas respectivas concentrações.

A irrigação na estufa do Viveiro Florestal foi realizada através de aspersão, sendo que a umidade relativa média do período do experimento 70,8% com desvio padrão de 18,2%. E a temperatura média ficou em 25,4°C e desvio padrão de 6,8°C.

O experimento foi conduzido por 28 dias, até que as primeiras plântulas de eucalipto a emergir completassem 21 dias.

As variáveis utilizadas para avaliar este experimento foram as seguintes:

Índice de velocidade de emergência até o sétimo dia após o início da emergência das plântulas, através do método descrito por POPINIGS (1977), descrito pela fórmula: $IVE = N_1/D_1 + N_2/D_2 + \dots + N_n/D_n$, onde N é igual ao número de plântulas emergidas no dia (1; 2; até n) e D o número de dias após a semeadura; percentual de tombamento de pós-emergência das plântulas (diário); e no final do experimento: comprimento em centímetros do caulículo (altura); comprimento da radícula e produção de massa de matéria fresca.

Para as análises bioquímicas foi coletada uma amostra de plântulas por tratamento, determinando teor de proteínas e fenóis totais e a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). Imediatamente após as coletas as amostras foram congeladas e armazenadas em freezer a -20°C até as avaliações.

Para avaliação da concentração de proteínas totais utilizou-se o método descrito por BRADFORD (1976), onde as amostras das plântulas de *E. saligna* foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 *giros* por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante obtido do processo foi coletado e levado para leitura em espectrofotômetro a 630 nm,

com soro albumina bovina como padrão.

Para avaliação da enzima FAL, as amostras armazenadas em freezer foram transferidas e maceradas em almofariz previamente gelado, onde acrescentou-se 6,0 mL do tampão de extração a 4°C, o qual foi preparado com mistura de 22,2g de Tris; 0,37g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 85,5g de sacarose; 10g de PVP (polivinilpirrolidona) e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada, ajustando o pH para 8,0 com ácido clorídrico 0,2N. após a maceração em solução tampão as amostras foram centrifugadas a 6.000 *giros* por 10 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi diluído pipetando-se 200 µL do mesmo e acrescentando-se 5 mL do tampão de extração.

A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978). Pipetou-se 1,5 mL de cada extrato enzimático em tubos de ensaio, acrescentando-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6mg mL⁻¹) ou água destilada na prova em “branco”. Incubou-se a 40°C por uma hora a mistura, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras no espectrofotômetro na faixa de 290 nm (RODRIGUES et al., 2006).

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em duas etapas, seguindo o método adaptado de BIELESKI e TURNER (1966). A primeira compreendeu a extração dos fenóis totais, realizada a partir da adição de 4 mL da solução metanol, clorofórmio e água (MCA), na relação 6:2,5:1,5 v/v, no material vegetal, com trituração em almofariz à temperatura ambiente, seguida de uma centrifugação a 6000 *giros* por 20 minutos, sendo coletado o sobrenadante.

Posteriormente, foi realizada nova extração do resíduo remanescente, adicionando-se 4 mL de MCA, centrifugando novamente a 6000 *giros* por 20 minutos e o sobrenadante sendo adicionado ao primeiro, obtendo-se assim o extrato MCA. A esse extrato foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, procedendo-se nova centrifugação a 6000 *giros* por 15 minutos para separação das fases.

A segunda etapa compreendeu a determinação de fenóis totais realizada pelo método adaptado conforme JENNINGS (1981). A quantificação de fenóis foi feita através de uma curva padrão utilizando tirosina. As amostras foram preparadas a partir da retirada de uma alíquota de 0,5 mL da parte superior do tubo de extração dos fenóis (extrato

MCA), a seguir adicionado 0,5 mL de água destilada, mais 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 15 minutos, foram adicionados 5 mL do reagente alcalino "A" (preparado com carbonato de sódio a 2% em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N), permanecendo durante 50 minutos até a leitura da absorbância em 760 nm, em espectrofotômetro. O resultado foi expresso em mg g⁻¹ de tecido fresco.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com auxílio do software ASSISTAT 7.6 BETA.

Primeiramente testou-se a normalidade dos dados através do Teste de Lilliefors e de homogeneidade de variâncias pelo Teste de Bartlett. Os dados coletados em porcentagem (como a variável porcentagem de emergência), não atenderam ao teste de normalidade, sendo assim transformados em $\arcsin \sqrt{(x/100)}$. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade de erro. Quando adequado foi realizada análise de regressão, determinando-se assim modelos matemáticos para explicar o comportamento das variáveis com as dosagens de quitosana aplicadas.

Resultados e Discussões

Não foram verificadas diferenças significativas para as variáveis: porcentagem de emergência, tombamento de pós-emergência, altura e massa de matéria fresca das plântulas de *E. saligna*.

As plântulas de *E. saligna* iniciaram a emergir no sétimo dia após o plantio, e a análise para índice de velocidade de emergência foi realizada para o décimo

quarto dia após a semeadura.

Observa-se na Figura 1, que houve significância de uma equação quadrática para explicar a tendência do IVE para *E. saligna*, com ponto de máximo de 1,3 na concentração de 0,94% de quitosana. Além disso, verificou-se que houve valores abaixo de 0,8, resultado obtido na concentração de 0% de quitosana.

A utilização de quitosana no tratamento das sementes de *E. saligna* trouxe características positivas para diminuir o tombamento de plântulas, pois de acordo com CAMPOS et al. (2009), quanto mais lenta for a emergência das plântulas, ou seja, menor o IVE, mais tempo estas estarão expostas a microrganismos patogênicos, havendo assim, maior probabilidade de ocorrer *damping-off* nas mudas.

MAZARO et al. (2009) avaliaram o efeito da utilização de quitosana no tratamento de sementes de beterraba e tomate no controle de tombamento de mudas causado pelo fungo *Rhizoctonia* sp., onde observaram que o polímero reduziu a incidência do problema, sendo mais eficiente nas concentrações entre 1,1% e 2,5%.

Estudando o efeito da cobertura de sementes de brócolis e salsa com quitosana, TANADA-PALMU (2005) descrevem que esta não afetou, em termos de capacidade de germinação e vigor em sementes de brócolis e no vigor de sementes de salsa.

O índice de emergência, apesar de ser aumentado pelo tratamento, em certa faixa foi afetado negativamente, pois em algumas concentrações tiveram resultados com menor IVE do valor obtido no tratamento testemunha (Figura 1).

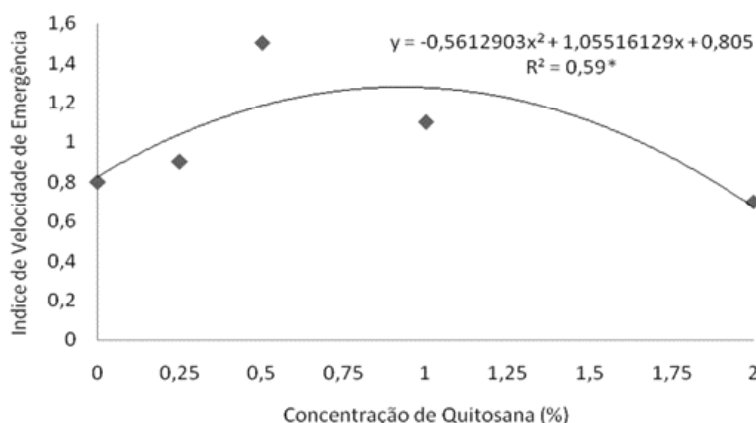


Figura 1. Índice de velocidade de emergência de plântulas de *E. saligna*, com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, 14 dias após a semeadura. *Significativo ao nível de probabilidade ($P < 0,05$).

O comprimento radicular foi influenciado pelo tratamento das sementes com quitosana (Figura 2), sendo a equação ajustável, polinomial cúbica, com maior e menor valores, nas concentrações de 0,33% e 1,52% de quitosana, respectivamente.

Para produção de mudas em viveiros florestais, um dos parâmetros de controle de qualidade a ser observado pelos viveiristas é o sistema radicular bem desenvolvido (WENDLING et al., 2002), com isso, o uso da aplicação de quitosana

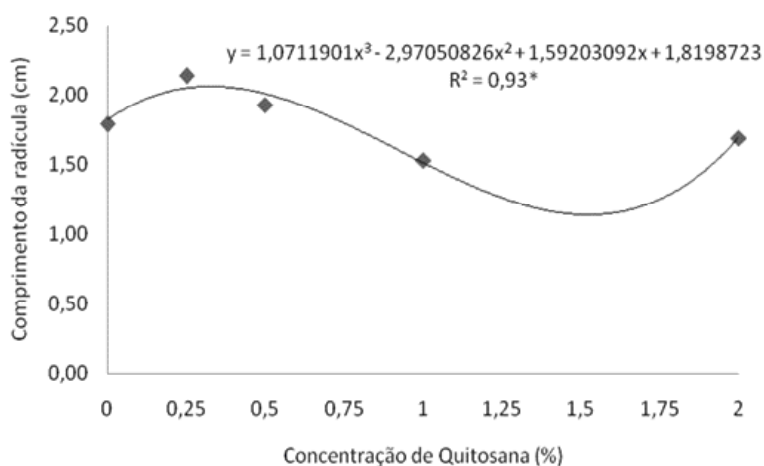


Figura 2. Comprimento da radícula de plântulas de *E. saligna* com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos 28 dias após a semeadura. *Significativo ao nível de probabilidade ($P < 0,05$).

em sementes de *E. saligna* deve ser cuidadoso, uma vez que observou-se certa faixa de concentração prejudicial para o desenvolvimento radicular.

Nas análises bioquímicas dos tecidos vegetais das plântulas de *E. saligna*, a concentração de 2% de quitosana não pode ser avaliada, pela baixa quantidade de material vegetal produzido.

Observou-se que o teor de proteínas e de compostos fenólicos dos tecidos vegetais, não

foram influenciados pelo tratamento das sementes com quitosana, Entretanto, a atividade da FAL foi influenciada pelo tratamento das sementes com quitosana, conforme se observa na Figura 3, comportamento quadrático com o aumento das concentrações do polímero.

O aumento da atividade da enzima FAL (Figura 3), indica que o polímero pode ter atuado como elicitor, induzindo resistência sistêmica nas

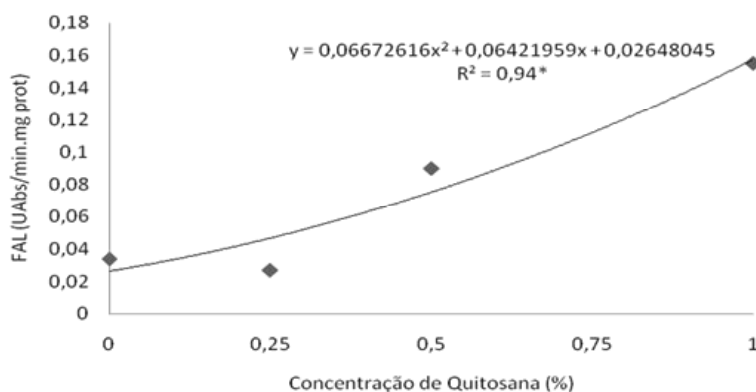


Figura 3. Atividade da enzima FAL de plântulas de *E. saligna* originárias de sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, aos 28 dias após a semeadura. *Significativo ao nível de probabilidade ($P < 0,05$).

plântulas. De acordo com CIA et al. (2007) a quitosana tem mostrado ser efetiva na ativação de respostas nos tecidos vegetais, induzindo o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e elicitando a produção de fitoalexinas.

MAZARO et al. (2009) verificaram que a quitosana induziu atividade bioquímica em tecidos foliares de plântulas de beterraba e tomate tratadas com quitosana, aumentando os teores de açúcares totais e redutores, proteínas totais e na atividade da FAL.

No presente trabalho a hipótese de indução de resistência não pode ser comprovada, pois o tratamento das sementes com quitosana, estatisticamente não influenciou as variáveis porcentagem de emergência e redução de tombamento de pós-emergência. Ainda, os teores de compostos fenólicos não foram influenciados, e de acordo com TAIZ e ZEIGER (2004), a FAL está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e o secundário, a qual catalisada regula a formação destes compostos.

Considerando os resultados obtidos, a

quitosana trouxe melhoria em alguns parâmetros das mudas no seu estágio inicial, no entanto os resultados ainda não são conclusivos para utilização deste indutor na produção de mudas de *E. saligna*.

Conclusão

A utilização de quitosana não diminuiu o tombamento de mudas de *Eucalyptus saligna*, entretanto, observaram-se resultados favoráveis em variáveis importantes para tornar as plântulas mais resistentes a esta doença, ativando o sistema de defesa, aumentando o teor da enzima FAL e em determinadas faixas de concentração aumentando o índice de velocidade de emergência e o comprimento radicular.

Sugere-se novos estudos, testando a indução de resistência da utilização do tratamento de quitosana nas sementes de *Eucalyptus saligna* e também de outras espécies de eucalipto, com outros patógenos causadores de *damping off*, além de *Rhizoctonia solani*.

Referências

- ARYA, A. Recent Advances in Management of Fungal Pathogens of Fruit Crops. In: ARYA, A.; PERELLÓ, A.E. **Management of Fungal Plant Pathogens**. London: Library of Congress Catalog, 2010, p.3-13.
- AZEVEDO, V.; COSTA, A.C.F.; CHAVES, S.A. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, 2007.
- BEDENDO, I.P. *DAMPING-OFF*. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011, p.435-441.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, p.278-293, 1966.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPOS, S.C.; SILVEIRA, S.F.; SILVA, R.F. et al. Tratamento químico de sementes de mamão visando ao controle de *Rhizoctonia solani*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.192-197, 2009.
- CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. et al. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: RODRIGUES, F.A.; ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa: UFV, p.245-280, 2007.
- DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.6, p.1121-1128, 2008.
- HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylen. **Plant Physiology**, v.62, p.31-35, 1978.

- JENNINGS, A.C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v.118, p.396-398, 1981.
- MAZARO, S.M.; WAGNER JÚNIOR, A.; SANTOS, I. et al. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.1424-1430, 2009.
- POPINIGS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1977, 329p.
- RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E.; 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.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E. da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v.30, p.129-137, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução: SANTAREM et al., 3ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.
- TANADA-PALMU, P.S. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, v.64, p.291-297, 2005.
- WENDLING, I.; FERRARI, M.P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiro e produção de mudas**. EMBRAPA: CNPF-Colombo, Documentos 79, 2002, 48p.