

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RITA DE CASSIA DOSCIATTI SERRÃO ROCHA

**QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE
PLÂNTULAS DE ESPÉCIES OLERÍCOLAS E NO CONTROLE DE
FITOPATÓGENOS *IN VITRO***

TESE

PATO BRANCO

2015

RITA DE CASSIA DOSCIATTI SERRÃO ROCHA

**QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO
DE PLÂNTULAS DE ESPÉCIES OLERÍCOLAS E NO CONTROLE DE
FITOPATÓGENOS *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial
para obtenção do grau de “Doutora em Agronomia” –
Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientadores: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaró

Coorientador: Prof. Dr. Jean Carlo Possenti

PATO BRANCO
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

- R672q Rocha, Rita de Cassia Dosciatti Serrão
Quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de espécies olerícolas e no controle de fitopatógenos *in vitro*/ Rita de Cassia Dosciatti Serrão Rocha. – 2015.
66 f. : il. ; 30 cm
- Texto em Português, com resumo em Inglês.
Tese (Doutorado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Agronomia. Pato Branco, 2015.
Bibliografia: f. 56-62.
1. Fungos. 2. Tomate. 3. Beterraba. 4. Pepino. 5. Indução de Resistência. 6. Quitinase
I. Mazaro, Sérgio Miguel, orient. II. Possenti, Jean Carlo, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD (21. ed.) 632.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca São José da Faculdade Mater Dei, Pato Branco-PR



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese n.º 002

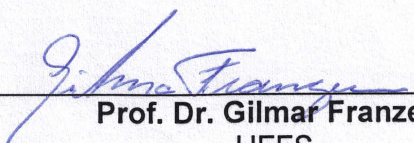
**Quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de espécies
olerícolas e no controle de fitopatógenos *in vitro***

por

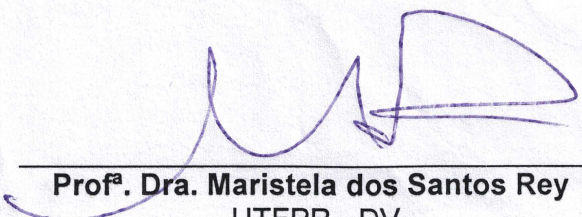
Rita de Cassia Dosciatti Serrão Rocha

Tese apresentada às quatorze horas do dia vinte e sete de março de dois mil e quinze, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

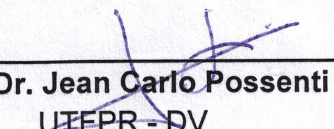
Banca examinadora:



Prof. Dr. Gilmar Franzener
UFFS



Prof.ª Dra. Maristela dos Santos Rey
UTFPR - DV

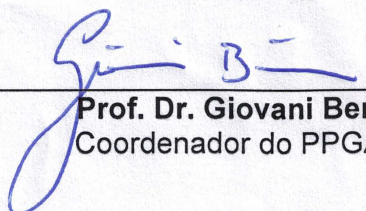


Prof. Dr. Jean Carlo Possenti
UTFPR - DV



Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro
UTFPR - DV
Orientador

Visto da Coordenação:



Prof. Dr. Giovani Benin
Coordenador do PPGAG

Dedico em memória dos meus pais Protásio e Deulinda Dosciatti que sempre me encorajaram a lutar por meu ideal e que me mostraram como viver por um ideal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida pela fé e oportunidades de me tornar cada dia uma pessoa mais feliz. Agradeço a minha mãe que há dois meses nos deixou, pelo carinho, força, fé e dedicação, não conseguiu esperar por mais esse objetivo em minha vida. Mas sei que está com aquele sorriso contagiante junto com meu amado pai. Ao meu marido Marcelo pelo amor e incentivo. À minha filha Júlia pela compreensão mesmo ficando triste quando estive fora para alcançar esse objetivo. Agradeço aos meus irmãos Carlos Henrique e Eden Ricardo que mesmo longe sempre me apoiaram nas minhas decisões. Ao meu orientador Professor Sérgio Miguel Mazaro pela dedicação, amizade, compreensão pelas sugestões e críticas sem as quais não teria chegado até aqui. À professora Maristela Rey pela ajuda no laboratório de Fitossanidade. Ao meu coorientador professor Jean Carlo Possenti pela colaboração. Aos meus colegas de laboratório que me ajudaram sem medir esforços, Douglas Bertoncelli, Nean Locatelli Dalacosta, Adriano Lewandowski, Karina Guollo, Ivan Zorzzi e Fabiana Bertinato, sentirei saudades dos nossos dias de trabalho, comilança e muitas risadas. Em especial a minha prima Kellen Boldrini Tolomeotti pelo incentivo, dedicação, confiança e a força nas horas difíceis que encontrei durante o Doutorado. Minha cunhada Mariza Dosciatti pelas orientações e ajuda no trabalho. A CAPES, pela bolsa concedida. Enfim, a todas as pessoas, que de uma forma ou outra colaboraram para a conclusão deste doutorado, meu sincero Obrigado!

“Não importa o tamanho dos grandes desafios que você já conquistou em sua vida, não importa o poder e o respeito que já atingiu, haverá sempre um novo desafio em sua frente. E para vencê-lo haverá necessidade de vigor, coragem, força e perseverança!” (**Autor Desconhecido**)

RESUMO

ROCHA, Rita de Cassia Dosciatti Serrão. QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE ESPÉCIES OLERÍCOLAS E NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS *IN VITRO*. 66 f. Tese – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

A indução de resistência é conceituada como a ativação de um estado de resistência contra doenças, o qual é induzido sistemicamente em plantas pela utilização de agentes bióticos ou abióticos, sem qualquer alteração do genoma da planta, ocorrendo de maneira não específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa vegetal. A quitosana é um polímero derivado da desacetilação da quitina, encontrada em grande quantidade na carapaça de crustáceos, sendo estudada com potencial para controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungistática direta, quanto pela capacidade de induzir a defesa das plantas, indicando a presença de moléculas com características elicitoras. Foram desenvolvidos três experimentos com objetivos de avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência a plântulas de beterraba (*Beta vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e pepino (*Cucumis sativus*) e no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn e *Pythium* sp. em condições *in vitro*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. As sementes de beterraba, tomate e pepino foram submersas em solução de quitosana por 20 minutos, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2% e na testemunha água destilada. As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato Plantmax Florestal® previamente esterilizado e inoculado com *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn e *Pythium* sp., respectivamente, para as três culturas. O experimento foi conduzido por 14 dias em câmara de cultivo com controle de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), luminosidade (fotoperíodo de 12 horas) e umidade relativa ($70\% \pm 10\%$). As avaliações realizadas foram emergência das sementes, tombamento de plântulas, comprimento de plântulas, massa da matéria fresca e atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), quitinases e β -1,3-glucanase. Foi avaliado também o crescimento micelial de *Fusarium* sp., *Pythium* sp. e *R. solani* em meio de cultura B.D.A. (Batata-Dextrose e Agar) contendo quitosana nas mesmas concentrações avaliadas nas sementes. Na cultura da beterraba, o tratamento de sementes com quitosana propiciou maior emergência e comprimento das plântulas, e reduziu o percentual de tombamento. O tratamento com quitosana ativou a resistência sistêmica adquirida com expressão das enzimas quitinases e β -1,3-glucanase. No tomate a quitosana na concentração de 0,25% favoreceu a emergência das plântulas, reduziu a incidência de tombamento e ativou as enzimas FAL, quitinases e β -1,3-glucanase. Em pepino, com concentração de até 0,5%, favoreceu a emergência das plântulas e reduziu a incidência de tombamento. A quitosana ativou as enzimas FAL e β -1,3-glucanase. A quitosana também apresentou ação fungistática sobre o crescimento inicial de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia solani* Kühn em condições *in vitro*, no entanto, tal ação não prevaleceu até o término do experimento. Para *Fusarium* sp. o aumento da concentração da quitosana resultou na redução do crescimento micelial *in vitro*.

Palavras-chave: Fungos, Tomate, Beterraba, Pepino, Indução de Resistência

ABSTRACT

ROCHA, Rita de Cassia Dosciatti Serrão. CHITOSAN IN THE INDUCTION OF RESISTANCE TO TIPPING SEEDLINGS OF VEGETABLE CROPS AND CONTROL OF PLANT PATHOGENS IN VITRO. 66 f. Tese – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

Induction of resistance is defined as the activation of a state of resistance against diseases which is induced systemically in plants by the use of biotic or abiotic agents without any modification of the plant genome, occurring non-specific way, by activating genes coding for various plant defense responses. Chitosan is a polymer derived from the deacetylation of chitin, which is found in large quantities in crustacean shell, and studied with the potential to control plant pathogens, both by its direct fungistatic action, as the ability to induce protection of plants, indicating the presence of molecules of elicitoras characteristics. Three experiments with objective of evaluating the potential of chitosan in the seedling resistance induction were developed, beet (*Beta vulgaris*) seeds, cucumber (*Cucumis sativus*) seeds and tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds, and the control of *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn e *Pythium* sp. in vitro conditions. The experimental design was completely randomized, with four replications. Beet seeds, tomato and cucumber were submerged in chitosan solution for 20 minutes, in concentrations of 0.25, 0.5, 1 and 2% in the control and distilled water. Seeds were sown in trays containing Plantmax Florestal[®] substrate sterilized and inoculated with *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn and *Pythium* sp., respectively for the three cultures. The experiment was conducted for 14 days in growth chamber with controlled temperature (25 °C ± 2°C), light (12 hour photoperiod) and humidity (70% ± 10%). The evaluations were seed emergency, seedling damping-off, seedling length, fresh weight and activity of the enzymes phenylalanine amônia-liase (PAL), chitinase and β -1,3-glucanase. It was also rated the mycelial growth of *Fusarium* sp., *Pythium* sp. and *R. solani* on P.D.A. (Potato-Dextrose and Agar) culture medium containing chitosan at the same concentrations evaluated in seeds. For beet growing, seed treatment with chitosan presented higher emergence and the length of the seedlings, and reduced the percentage of tipping. Treatment with chitosan activated the systemic acquired resistance with expression of chitinase and β -1,3-glucanase enzymes. For the tomato crop in chitosan concentration of 0.25% favored the emergency of seedlings, reduced the incidence of tipping and activated the PAL enzymes, chitinase and β -1,3-glucanase. In cucumber on the concentration of up 0.5% favored seedlings emergence and reduces the incidence of tipping. Chitosan activated the PAL enzymes and β -1,3-glucanase. Chitosan also presented fungistatic action on the initial growth of *Pythium* sp. and *R. solani* in vitro conditions, however, such action did not prevail until the end of the experiment. To *Fusarium* sp. the concentration of chitosan resulted in the reduction of mycelial growth in vitro.

Keywords: Fungi, Tomato, Beet, Cucumber, Resistance Induction

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Emergência (A), incidência de tombamento (B) e comprimento (C) de plântulas de beterraba submetidas ao tratamento de sementes com diferentes concentrações de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	29
FIGURA 2	– (A) Atividade da enzima quitinase, (B) Atividade da enzima β -1,3-glucanase, (C) Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase, a partir de plântulas de beterraba submetidas ao tratamento de sementes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014.	31
FIGURA 3	– Crescimento micelial de <i>Fusarium</i> sp. submetidos a aplicação de concentrações crescentes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014.	32
FIGURA 4	– Emergência de sementes de pepino submetidas ao tratamento com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	39
FIGURA 5	– Incidência de tombamento de plântulas de pepino submetidas ao tratamento de sementes com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	40
FIGURA 6	– Comprimento de plântulas de pepino submetidas ao tratamento de sementes com quitosana e a inoculação de <i>Pythium</i> sp.. Dois Vizinhos - PR, 2014	41
FIGURA 7	– Atividade das enzimas FAL (A), quitinase (B), β -1,3-glucanase (C) a partir de plântulas de pepino submetidas ao tratamento de sementes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	42
FIGURA 8	– Crescimento micelial de <i>Pythium</i> sp. submetidos a aplicação de concentrações crescentes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	43
FIGURA 9	– Emergência de sementes de tomate submetidas ao tratamento com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	50
FIGURA 10	– Comprimento de plântulas de tomate submetidas ao tratamento de sementes com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	51
FIGURA 11	– Incidência de tombamento de plântulas de tomate submetidas ao tratamento de sementes com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	51
FIGURA 12	– (A) Atividade da enzima FAL, (B) Atividade da enzima quitinase, (C) Atividade da enzima β -1,3-glucanase, a partir de plântulas de tomate submetidas ao tratamento de sementes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	53
FIGURA 13	– Crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn submetidos a aplicação de concentrações crescentes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014	54
FIGURA 14	– Sementes olerícolas	63
FIGURA 15	– Análises bioquímicas	63
FIGURA 16	– Análises bioquímicas	64
FIGURA 17	– Preparação de quitosana	64
FIGURA 18	– Inoculação dos fungos com meio B.D.A. com quitosana	64
FIGURA 19	– Inoculação dos fungos no meio B.D.A.	65
FIGURA 20	– Experimento em bandejas de poliestireno	65
FIGURA 21	– Experimento em bandejas de poliestireno	66

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B.D.A.	Batata-Dextrose-Ágar
B.O.D.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DERAL	Departamento de Economia Rural
FAL	<i>Fenilalanina Amônia-Liase</i>
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i>
LMRP	Limite Máximo de Resíduo Permitido
PAL	<i>Phenylalanine Amônia-Liase</i>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
RPMs	rotações por minuto
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i>
SEAb	Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
WPTC	<i>World Council Tomato Processors</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

β	<i>Beta</i>
$^{\circ}\text{C}$	Graus <i>Celsius</i>
g	Gramma
%	Porcentagem
$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Miligramas por Mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
μL	Micro Litro
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3	QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE BETERRABA E NO CONTROLE DE <i>Fusarium</i> sp. <i>IN VITRO</i>	23
3.1	RESUMO	23
3.2	ABSTRACT	23
3.3	INTRODUÇÃO	24
3.4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.5	RESULTADO E DISCUSSÃO	29
3.6	CONCLUSÕES	33
4	QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE PEPINO E NO CONTROLE DE <i>Pythium</i> sp. <i>IN VITRO</i>	34
4.1	RESUMO	34
4.2	ABSTRACT	35
4.3	INTRODUÇÃO	35
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.5	RESULTADO E DISCUSSÃO	39
4.6	CONCLUSÕES	44
5	QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE TOMATE E NO CONTROLE DE <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn <i>IN VITRO</i>	45
5.1	RESUMO	45
5.2	ABSTRACT	45
5.3	INTRODUÇÃO	46
5.4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.5	RESULTADO E DISCUSSÃO	50
5.6	CONCLUSÕES	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	56
	Anexo A – REGISTROS DOS EXPERIMENTOS	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (AMBIENTE, 2015). Os resultados do monitoramento do último Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA (ANVISA, 2013), mostra que 36% das amostras de 2011 e 29% das amostras de 2012 apresentaram resultados insatisfatórios. De acordo com relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2015) existem dois tipos de irregularidades: (i) quando a amostra contém agrotóxico acima do Limite Máximo de Resíduo Permitido (LMRP); e (ii) quando a amostra apresenta resíduos de agrotóxicos não autorizados para o alimento pesquisado. Das amostras insatisfatórias, cerca de 30% se referem a agrotóxicos que estão sendo reavaliados pela ANVISA.

Estes fatos, somado à crescente exigência do mercado por produtos vegetais de qualidade, livres de contaminação por microrganismos e resíduos químicos, intensifica as pesquisas visando à exploração de produtos mais saudáveis (ALVES; PERINA, 2014). Alternativas mais sustentáveis como a indução de resistência em plantas surgem com o propósito de minimizar danos causados ao ambiente, estimulando respostas relacionadas aos mecanismos de defesa naturais encontrados em plantas. A indução de resistência através de elicitores mostra-se como alternativa viável e passível de utilização em sistemas orgânicos de produção (PIERO et al., 2014).

A indução de resistência é conceituada como a ativação de um estado de resistência contra doenças, induzido sistemicamente em plantas pela utilização de agentes externos bióticos ou abióticos, sem qualquer alteração do genoma da planta. Ocorrendo de maneira não-específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa (STADNIK, 2000) (HAMMERSCHMIDT et al., 2001).

A RSA (Resistência Sistêmica Adquirida) pode ser conceituada como um mecanismo de defesa induzida por agentes bióticos ou abióticos ou infecção localizada por patógenos, que confere proteção à planta a um amplo espectro de microrganismos. Caracteriza-se pela expressão de genes que codificam diversas respostas de defesa a patógenos nas plantas,

tais como: (i) as proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-RP), como quitinases e glucanases; (ii) enzimas envolvidas na rota da síntese de fitoalexinas, como a fenilalanina amônia-liase; (iii) acúmulo de lignina em tecidos adjacentes ao local de penetração do microrganismo (DURRANT; DONG, 2004).

A quitosana tem demonstrado potencial como indutor de resistência para o controle de doenças em várias plantas. A quitosana é um amino polissacarídeo, derivado da desacetilação da quitina, a qual se constitui na maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e da parede celular dos fungos. É considerada, após a celulose, como composto orgânico mais importante da natureza (AZEVEDO et al., 2007).

A quitosana age ligando-se a receptores presentes na membrana celular das plantas, mimetizando o fenômeno de reconhecimento que ocorre em uma interação incompatível entre a planta e o patógeno (LABANCA, 2002). A quitosana pode inibir as proteinases, alterar o metabolismo das fitoalexinas, promover a lignificação (TERRY; JOYCE, 2004), induzir a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BANOS et al., 2006), ativar as enzimas quitinases e β -1,3-glucanase (GHAOUTH et al., 1992) (ZHANG; QUANTICK, 1998), fenilalanina amônia-liase (ROMANAZZI et al., 2006) e peroxidase (ZHANG; QUANTICK, 1997). Pode atuar ainda na inibição de enzimas de desestruturação da parede celular sintetizada por fungos, como a poligalacturonase, pectinaliase e celulase, e nos compostos tais como ácidos orgânicos (oxálico e fumárico) e toxinas específicas, como alternariol (REDDY et al., 1998).

De uma forma geral, Devlieghere et al. (2004) citaram que a quitosana pode atuar de três formas distintas na proteção das plantas: (i) inibindo o crescimento dos fungos, principalmente se estes possuírem quitina como constituinte principal da parede; (ii) induzindo a produção da enzima quitinase; e (iii) elicitando a produção de fitoalexinas pela planta. Na agricultura, várias pesquisas têm sido realizadas com a aplicação de quitosana, em especial no controle de podridões pós-colheita de frutas e hortaliças (DUTTA et al., 2009). Ainda, recentes pesquisas tem demonstrado seu efeito no controle de tombamento de plântulas pela ativação de rotas de defesa vegetal (MAZARO et al., 2009) (FREDDO et al., 2012).

Tombamento de plântulas causa lesões deprimidas nos tecidos vegetais jovens, que provocam o fendilhamento ou constrição do caule e levam ao tombamento da muda. É causado principalmente por fungos dos gêneros *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cercospora* e *Botrytis*, e pelas bactérias dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (BEDENDO, 1995).

Dentre as espécies olerícolas o tomate, a beterraba e o pepino, possuem perdas pelo tombamento de plântulas na fase de produção de mudas ou no início do cultivo a campo.

O tomateiro é uma olerácea amplamente difundida em todos os estados brasileiros, sendo a segunda mais cultivada em área no país, superada somente pela batata-inglesa (*Solanum tuberosum*) (MELO, 2012). Estimativas do Conselho Mundial de Processadores de Tomate (WPTC - *World Council Tomato Processors*) indicam que o volume produzido globalmente cresceu 16 % no ano 2014 em relação a 2013. Para o Brasil, a WPTC indica crescimento de 7%, com 1,6 milhões de toneladas. Dentre os países que exportam atomatados ao Brasil, o maior aumento foi observado na China, de expressivos 43%, com a produção passando para 5,5 milhões de toneladas. A Itália, o Chile e os Estados Unidos, também registraram aumento na produção, de 18% (4,8 milhões de toneladas), de 16% (860 mil toneladas) e de 11% (12,4 milhões de toneladas) (CARDOSO; SILVA, 2003). O Paraná detém hoje 7% da produção nacional de tomate, sendo o quarto maior produtor, perdendo somente para São Paulo, Goiás e Minas Gerais, segundo dados do Departamento de Economia Rural (DERAL) da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAb). Na safra 2014, plantada entre os meses de agosto a janeiro, o Paraná colheu 165,86 mil toneladas. A produção do ano de 2015 deverá ser 5% menor em relação ao mesmo período da safra anterior (DERAL, 2015). Anualmente várias toneladas de tomate são deixadas de produzir devido a danos causados por doenças, sendo que nos estágios iniciais da cultura a doença que mais causa perdas na produção é o tombamento de plântulas ou *damping-off*, sendo na maioria dos casos causado pelo fungo *Rhizoctonia solani* que é considerado um parasita primitivo e não especializado, capaz de causar podridões de sementes e tombamentos de pré e pós-emergência em várias culturas em condições ambientais muito amplas (MICHEREFF et al., 2005).

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma planta de origem Asiática, sendo cultivado na Índia há mais de 300 anos, com boa adaptação e produção em ambientes protegidos e no campo (FONTES, 2005). No Brasil tem sido evidenciada sua importância, por ser um fruto bastante apreciado e consumido sob a forma de fruto imaturo, em saladas e dentre outras formas de consumo (CARDOSO; SILVA, 2003). Alguns produtores de hortaliças do Brasil cultivam intensamente o pepino em ambientes protegidos desde a década de 80, porém, esta prática além de contribuir para um aumento da produtividade e da qualidade, resulta também em problemas relacionados à incidência de doenças, principalmente à patógenos de solo (COSTA et al., 2001).

Acredita-se que espécies silvestres de beterrabas (*Beta vulgaris* L.) tenham sido originadas da região Mediterrânea e do norte da África. Todavia sua distribuição geográfica alcança desde a Índia Oriental a Ocidental, indo em direção oeste das Ilhas Canárias e costa ocidental da Europa, incluindo Ilhas Britânicas e Dinamarca (FONTES, 2005). No Brasil seu cultivo intensificou-se grandemente com a imigração européia e asiática. Nas últimas décadas, a área cultivada com essa hortaliça tuberosa apresentou grande aumento, sobretudo no sudeste,

onde se encontram 42% das propriedades produtoras (FONTES, 2005). No Paraná a área plantada é de 3.527 ha, com uma produção de 92.881 toneladas (DERAL, 2015)

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de beterraba (*Beta vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e pepino (*Cucumis sativus*) e no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn, e *Pythium* sp. em condições *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A olericultura é um ramo da horticultura que envolve a exploração de um grande número de espécies de plantas, mais conhecidas como hortaliças, e que engloba culturas folhosas, raízes, bulbos, tubérculos e frutos diversos, sendo uma alternativa rentável para o agronegócio do país (MACHADO et al., 2007), além de serem parte integrante da dieta da população mundial (MORETTI, 2003).

O Brasil destaca-se mundialmente produzindo cereais, leguminosas e oleaginosas, sendo que na safra de 2014, esta produção atingiu mais de 190 milhões de toneladas (IBGE, 2014). Durante todo o processo de produção, em média de 14% é perdido devido a doenças (AGRIOS, 2005), o que representaria mais de 26 milhões de toneladas de produtos, em perdas. As hortaliças pertencem ao grupo de alimentos conhecidos como reguladores ou protetores, por serem ricos em vitaminas, sais minerais e fibras, nutrientes importantes para regular as funções do corpo e protegê-lo contra vários tipos de doenças. O valor nutritivo varia de acordo com a parte comestível da planta. Entre os nutrientes fornecidos pelas hortaliças, estão as vitaminas, os minerais e as fibras, e com isso o consumo vem aumentando pela população por um hábito mais saudável de vida (EMATER, 2015).

Atualmente o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (AMBIENTE, 2015). Contudo, a maior parte dos pesticidas é dispendiosa (NAIKA et al., 2006) o controle químico de doenças de plantas, pelo uso de fungicidas, é o mais utilizado, e em virtude do uso incorreto destes produtos, ocorre contaminação ao meio ambiente, preservação dos recursos naturais e da população (GHINI; KIMATI, 2000). Assim observa-se o crescimento do sistema de produção orgânica, que visa diminuir os efeitos adversos do uso de produtos químicos no ecossistema, por meio de métodos alternativos de controle de pragas e doenças, preservação das propriedades do solo, manejo de plantas daninhas, cobertura morta, adubação verde e rotação de cultura (LUZ et al., 2007). Além de optar pela adoção de medidas preventivas com o objetivo de dificultar a ocorrência de fitopatógenos em níveis populacionais que causem danos econômicos ao invés de se utilizar medidas curativas, que são usadas apenas quando as doenças já ocorrem em níveis economicamente indesejáveis (BETTIOL, 2015).

As olerícolas apresentam alta suscetibilidade a diversas doenças durante seu cultivo, entre estas, o tombamento de plântulas, também chamado de *damping-off* que afeta tecidos vegetais jovens, causando lesões deprimidas que provocam fendilhamento ou constrição do caule, levando ao tombamento da muda.

O tombamento de plântulas é causado principalmente por fungos do gênero *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp. e bactérias dos gêneros *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. (BEDENDO, 1995).

O gênero *Fusarium* sp. apresenta espécies anamórficas e teleomórficas. Alguns exemplos são anamorfo *episphaeria* do teleomorfo *Nectria episphaeria*, anamorfo *rigidiuscula* do teleomorfo *Calonectria rigidiuscula* nos quais as formas anamórficas e teleomórficas (URBEN, 2009). A murcha de *Fusarium*, ou *fusariose*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* ocorre no nordeste brasileiro desde 1935 e em, São Paulo, desde 1957/58, disseminando-se para outros estados (MENDES; URBEN, 2015).

Rhizoctonia sp. caracteriza-se por não produzir esporos durante a fase vegetativa, ou seja, apresenta micélio estéril que não forma esporos assexuados. As hifas são bem desenvolvidas, com septos transversais evidentes, ramificando-se de modo bastante característico, formando ângulo reto em relação à hifa de origem. O micélio é vigoroso sendo inicialmente hialino e evoluindo posteriormente para marrom escuro. O fungo produz estruturas de resistência denominadas escleródios de formato irregular, escuros e que produzem hifas ao germinar (DOMINGUES; TOFOLI, 2008).

Os oomicetos dos gêneros *Pythium* possuem hifas sem septos que formam um micélio branco e esparso. Produzem estruturas reprodutivas sexuadas conhecidas como anterídios e oogônios e assexuadas chamadas esporângios. Na reprodução sexuada o oogônio (estrutura feminina) é fecundado pelo anterídio (estrutura masculina) dando origem ao oósporo. Na reprodução assexuada em *Pythium*, as hifas produzem os esporângios intercalar ou apicalmente, sendo seu formato variável. Os esporângios formam vesículas onde se diferenciam os zoósporos biflagelados que, após liberados, nadam, encistam e depois germinam para poderem penetrar no hospedeiro (DOMINGUES; TOFOLI, 2008).

Para controlar o ataque desses principais fungos, muitos pesquisadores vêm desenvolvendo métodos de controle menos agressivos ao meio ambiente, procurando demonstrar a eficiência de produtos animais e vegetais, principalmente a indução de resistência envolvendo a ativação de mecanismos de defesa latentes existente nas plantas, ocorrendo naturalmente como resultado de uma infecção limitada do patógeno, quando a planta desenvolve uma reação de hipersensibilidade (LOON et al., 1998), ou também em resposta ao tratamento

com agentes bióticos (microrganismos ou substâncias de origem microbiana) e abióticos (substâncias de origem química) (BONALDO et al., 2005), sendo conhecida como resistência sistêmica adquirida (“*Systemic Acquired Resistance*”, SAR) ou indução de resistência sistêmica (“*Induced Systemic Resistance*”, ISR) (HAMMERSCHMIDT et al., 2001), (GUZZO et al., 2004).

A RSA se caracteriza pela manifestação ou produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção que provoca necrose e translocação destes sinais para outras partes da planta, induzindo reações de defesa que protegerá a planta contra agressões subsequentes (WARD et al., 1991). Também se caracteriza pela expressão de genes que codificam diversas respostas de defesa a patógenos nas plantas, tais como as proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-RP), como quitinases e glucanases; enzimas envolvidas na rota da síntese de fitoalexinas, como a fenilalanina amônia-liase; acúmulo de lignina em tecidos adjacentes ao local de penetração do microrganismo (DURRANT; DONG, 2004).

Os primeiros relatos de indução de resistência foram descritos por Beauverie (1901) e Ray (1901), no qual obtiveram indução de resistência em begônias pelo uso de isolados atenuados de *Botrytis cinerea* e relacionaram a indução com as condições ambientais de cultivo. Entretanto, o grande acontecimento ocorreu com a descoberta da indução de resistência pelo professor Joseph Kuć da Universidade de Lexington, Kentucky, EUA, quando em 1975 descreveu a ativação das defesas próprias de plantas de pepino após uma pré-infecção por um patógeno (CASTRO et al., 2007).

No Brasil, os primeiros estudos foram desenvolvidos em 1970, no Instituto Biológico, pela Dra. Walkyria B. C. Moraes em plantas de café contra *Hemileia vastatrix*, com o uso de uredosporos inativados de *H. vastatrix* (BONALDO et al., 2005). Na indução de resistência existem vários indutores que são agentes de origem biótica e abiótica, conforme seu modo de ação indutora capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas (SMITH, 1996). Estes agentes podem apresentar natureza química variada, demonstrando a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1998). Quando plantas são tratadas com indutores abióticos a rota dos fenilpropanóides é ativada (MEDEIROS et al., 2011) e abióticos (LANDI et al., 2014), portanto, espera-se que em plantas com defesa induzida, além do benefício de controle da doença, os frutos e grãos colhidos contenham uma maior concentração destas substâncias e levam também um maior benefício para saúde humana.

Quanto aos agentes abióticos foi demonstrado que diferentes compostos inorgânicos ou orgânicos não relacionados estruturalmente induzem resistência em plantas ao ataque

por insetos herbívoros e contra doenças causadas por nematóides, bactérias, fungos e vírus (HAMMERSCHMIDT et al., 2001). Entre os compostos inorgânicos podem ser mencionados, o ácido β -aminobutírico (BABA), o ácido salicílico (AS) e seus análogos funcionais, como o ácido-dicloroisonicotínico (INA) e o ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 arbotiólico (acibenzolar-S-metil - ASM) (GUZZO et al., 2004). Os indutores de resistência não apresentam, normalmente, ação antimicrobiana direta (GUZZO et al., 2004), (DURRANT; DONG, 2004), mas atuam como moléculas sinalizadoras de respostas de defesa da planta. Ao serem reconhecidas pelas células vegetais induzem a expressão de genes que codificam a síntese de compostos de resistência, impedindo ou dificultando o estabelecimento e/ou desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas da doença.

Os mecanismos de defesa envolvidos incluem a resposta de hipersensibilidade; alterações estruturais no tecido vegetal, como calose, lignificações e formação de papilas; acúmulo de substâncias tóxicas ao patógeno, como espécies ativas de oxigênio (EAOs), fitoalexinas, ou proteínas relacionadas à patogênese (PR- Proteínas); fenilpropanóides; produtos do metabolismo secundário, como fenilalanina amônia-liase (PAL) e peroxidases (DURRANT; DONG, 2004), (CAVALCANTI et al., 2005), (RESENDE et al., 2007).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima que catalisa a reação de conversão de *L fenilalanina* em ácido trans cinâmico. A FAL é uma enzima chave na rota dos fenilpropanóides estar envolvida na biossíntese de compostos de polifenóis, tais como os flavonóides e lignina em plantas. A atividade da FAL pode ser regulada por diversos fatores, e embora presente constitutivamente nos tecidos vegetais, é aumentada mediante a maioria das infecções (LOON et al., 1998). Extratos de patógenos, como o fungo *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora cactorum*, usados como eliciadores, aumentam a atividade da FAL (ORSOMANDO et al., 2003), (BROETTO et al., 2005).

As quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise de quitina, um resíduo linear insolúvel de *N-acetil-glucosaminas* unidas através de ligações β -1,4 e possuem vários papéis biológicos. Em microorganismos, as quitinases estão envolvidas na morfogênese da parede celular e nos processos nutritivos. Em plantas, elas parecem estar envolvidas na defesa contra patógenos e a estresses abióticos. Evidências que suportam o papel das quitinases em plantas se confirmam pelo fato de que durante a infecção por patógenos e sob o efeito de várias formas de estresses do meio ambiente elas são induzidas. As aferições de quitinases têm sido indicativas como agente de controle efetivo contra fungos fitopatogênicos e insetos (EL-KATATNY et al., 2001).

Cinco classes de quitinases de plantas têm sido propostas com base na similaridade

das suas sequências de aminoácidos. A classe *I* de quitinases contém um domínio rico de cisteína na região do N-terminal envolvido na ligação da quitina e um peptídeo no C-terminal altamente conservado. Este tipo de quitinase é conhecido por existir em grande quantidade nas monocotiledôneas e dicotiledôneas. As quitinases da classe *II* tem alta similaridade de sequência com as da classe *I* e são secretadas no apoplasto. A classe *III* não mostra identidade de sequência com outras classes, mas parece estar mais próxima de enzimas de fungo envolvidas na morfogênese. Tipicamente, elas são proteínas extracelulares e têm atividade de lisoenzima. As classes *IV* tem significativa similaridade com as da classe *I*, pois contém um domínio rico em cisteína e mostram o principal domínio catalítico da classe *I*, embora com duas deleções características. Quitinases desta classe são extracelulares e têm sido identificadas principalmente em dicotiledôneas. A classe *V* compreende um grupo de endoquitinases não relacionadas às outras quitinases de plantas. Estas possuem uma estrutura sequência primária que parece ter sido derivada durante a evolução de bactérias (EL-KATATNY et al., 2001).

Quitinases estão altamente ligadas com o sistema de defesa das plantas contra fitopatógenos, por isso tem sido demonstrado que quitinases de plantas são induzidas pelo ataque de fungos ou pelo contato com algum elicitor, inibindo diretamente o crescimento do fungo *in vitro*. As β -1,3-glucanases são proteínas abundantes distribuídas amplamente nas espécies vegetais e possuem, dentre outras, a função de defesa contra patógenos invasores, particularmente em sinergismo com quitinases, que degradam o homopolímero linear (β -1,4-N-acetilglucosamina, componente abundante da parede celular de muitos patógenos (EL-KATATNY et al., 2001).

Endo β -1,3 glucanases catalisam a hidrólise da união de β -1,3-D-glucosil em calose, laminarina e em vários outros carboidratos encontrados em parede celular de fungos e plantas. As diversas funções biológicas de glucanases têm sido relatadas por SIMMONS (1994). As β -1,3 glucanases estão incluídas na família de proteínas PR porque muitas formas são rapidamente induzidas durante a invasão de fungos. Geralmente, as glucanases desempenham um papel importante na defesa da planta, pois digerem componentes da parede do fungo patogênico. Estas enzimas são também induzidas por uma variedade de fatores abióticos, mais notavelmente o gás etileno e ácido salicílico.

Em fungos, β -1,3-glucanases parecem ter diferentes funções, primeiro, um papel fisiológico no processo morfogenético/morfolítico durante o desenvolvimento e diferenciação do fungo. Segundo, relata-se que β -1,3-glucanases têm sido utilizadas para a mobilização de β -1,3-glucanas sob condições de exaustão de fonte de carbono e energia, funcionando como enzimas autolíticas. Finalmente, um papel nutricional em saprófitos e em micoparasitas tem

sido sugerido (EL-KATATNY et al., 2001).

Dentre estas alternativas que vem sendo estudadas encontra-se a quitosana. Esta substância é um polímero policatiônico β -1,4 ligado à D-glucosamina definido como um diacetilato de quitina, sendo um polissacarídeo natural extraído da casca ou exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo, lagosta (TAN et al., 1996). N- acetil -D- glucosamina possui efeito antimicrobiano, e a capacidade de formar géis (KHOR; LIM, 2003).

A quitosana tem demonstrado potencial como indutor de resistência para o controle de doenças em várias espécies. A quitosana é um amino polissacarídeo, derivado da desacetilação da quitina, a qual se constitui na maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e da parede celular dos fungos. É considerada, após a celulose, como composto orgânico mais importante da natureza (AZEVEDO et al., 2007).

Quitosana na agricultura, tem sido aplicada como biofilme na preservação de frutas, legumes e sementes contra a deteriorização por microrganismos, para estimular o sistema imune da planta, proteger a planta contra o ataque de patógenos (HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008) e favorecer o seu crescimento e conseqüentemente aumentar a produção vegetal

A quitosana é um polissacarídeo que protege a planta da ação fungos patogênicos, ativando seus mecanismos de defesa. Essa substância na planta estimula a produção de espécies reativas de oxigênio; inibe a ação de proteinases; altera o metabolismo das fitoalexinas; promove a lignificação; induz a formação de compostos fenólicos; ativa as enzimas quitinases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase e peroxidase; e estimula o acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade (STAMFORD et al., 2008). Durante a interação planta-fitopatógeno, este biopolímero pode induzir a síntese de barreiras estruturais nos locais de penetração do fitopatógeno no hospedeiro, como por exemplo, a suberização da célula vegetal e a lignificação de alguns órgãos da planta (BAUTISTA-BANOS et al., 2006).

A quitosana é um biopolímero de grande interesse para a agricultura, porque regula a transcrição de genes envolvidos com a produção de enzimas ligadas à resistência da planta às doenças e insetos. Quitosana diminui a incidência de tombamento de plântulas causado por fungos de solo (MAZARO et al., 2009). Maçãs submersas em soluções de quitosana agiram positivamente contra o ataque do fungo *Colletotrichum acutatum* em podridão amarga (FELIPINI; PIERO, 2009).

Quitosana reduziu a incidência e severidade do Mofo Cinzento causado por *B. cinerea* em uvas, quando a quitosana 10 mg mL⁻¹ foi aplicada na forma de gotas sobre ferimentos (ROMANAZZI et al., 2002). Também obtiveram resultados semelhantes quando a mesma dose

de quitosana foi aplicada na forma de gotas sobre ferimentos em tomates, à inoculação com *Penicillium expansum* e *B. cinerea*.

OH et al. (1998) sugeriram que a quitosana tem um duplo efeito na interação patógeno-hospedeiro, a atividade antifúngica e a ativação das respostas de defesa da planta, como a produção de enzimas. (BAUTISTA-BANOS et al., 2006) observaram que quitosana 2 e 3% tem efeito fungicida sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em teste *in vitro*, assim como o controle da antracnose em frutos de mamão quando tratados com 1,5% de quitosana. Resultados positivos com o uso de quitosana também foram reportados para o controle de *Botrytis cinerea* em uvas e morangos (BARKA et al., 2004) e para *Puccinia arachidis*, em amendoim (SATHIYABAMA; BALASUBRAMANIAN, 1998).

Através das pesquisas realizadas nos últimos anos, a quitosana tem demonstrado um potencial para ser aplicada na agricultura favorecendo o aumento da produção vegetal. Está confirmado a capacidade deste polissacarídeo na indução de resistência nas plantas e no biocontrole de alguns microrganismos fitopatogenos, sendo deste modo uma alternativa na substituição dos pesticidas químicos que, ao contrário da quitosana, são prejudiciais ao meio ambiente. Entretanto, mais pesquisas são importantes e necessárias para reforçar a capacidade do uso da quitosana na agricultura como uma alternativa que substitua ou complemente os métodos atuais, otimizando-os de modo que seja alcançado um resultado positivo para o aumento da produtividade agrícola, sem subestimar a preocupação com a qualidade ambiental e de vida do ser humano.

3 QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE BETERRABA E NO CONTROLE DE *Fusarium* sp. *IN VITRO*

3.1 RESUMO

A cultura da beterraba apresenta suscetibilidade à diversas doenças durante seu cultivo, entre estas, o tombamento de plântulas. A quitosana é um produto obtido à partir da quitina oriunda de crustáceos, que tem despertado interesse pelo seu efeito na indução de resistência em plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência à plântulas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) e no controle de *Fusarium* sp. *in vitro*. As sementes de beterraba foram submersas em solução de quitosana por 20 minutos, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2% e água destilada na testemunha. As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato inoculado com *Fusarium* sp., e mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h e temperatura de 25 °C ± 2 °C por 14 dias. Após este período, foi avaliado a emergência das sementes, tombamento de plântulas, comprimento de plântulas, massa da matéria fresca e atividade das enzimas (FAL), quitinases e β -1,3-glucanase. Foi avaliado também o crescimento micelial de *Fusarium* sp. em meio de cultura B.D.A. (batata-dextrose-ágar) contendo quitosana, nas mesmas concentrações testadas nas sementes. O tratamento de sementes com quitosana propiciou maior emergência e o comprimento das plântulas e reduziu o percentual de tombamento. O tratamento com quitosana também ativou a resistência sistêmica adquirida com expressão das enzimas quitinases e β -1,3-glucanase. O aumento da concentração da quitosana resultou na redução do crescimento micelial de *Fusarium* sp. *in vitro*.

Palavras-chave: *Damping-off*. Fenilalanina-amônia-liase. Quitinases. β -1,3-glucanase.

3.2 ABSTRACT

CHITOSAN ON RESISTANCE INDUCTION TO THE BEET TIPPING AND CONTROL *Fusarium* sp. *IN VITRO*

The beet growing has susceptibility to various diseases during cultivation, among these, the

tipping seedlings. Chitosan is a product obtained from chitin originating from the shellfish, which has attracted attention for their effect on the induction of resistance in plants. The objective of this study was to evaluate the potential of chitosan in beet seedlings resistance induction (*Beta vulgaris*) and the control of *Fusarium* sp. in vitro. Beet seeds were submerged in chitosan solution for 20 minutes in concentrations of 0.25; 0.5; 1.0 and 2.0% and distilled water in control. The seeds were sown in polystyrene trays containing substrate inoculated with *Fusarium* sp., And maintained in a growth chamber with a photoperiod of 12 hours and a temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 14 days. After this period, it was evaluated seed germination, seedling damping-off, seedling length, fresh weight and activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chitinase and β -1,3-glucanase. It was also rated the mycelial growth of *Fusarium* sp. in culture medium PDA (potato-dextrose and agar) containing chitosan at the same concentrations tested in seeds. Seed treatment with chitosan presented higher emergence and seedlings length and reduced the percentage of tipping. Treatment with Chitosan also activated the systemic acquired resistance with expression of chitinase and β -1,3-glucanase enzymes. Increasing the concentration of chitosan resulted in reducing the mycelial growth of *Fusarium* sp. in vitro.

Keywords: Damping-off. Phenylalanine ammonia-lyase. Chitinases. β -1,3-glucanase.

3.3 INTRODUÇÃO

A beterraba é uma olerícola de raiz tuberosa originária da Europa e Norte da África, pertencente à família Quenopodiácea. Apresenta elevado consumo no mundo, ocupando lugar de destaque entre as hortaliças, principalmente pelo seu valor nutritivo, sobretudo rica em diversos minerais e vitaminas. Além de possuir propriedades medicinais (FERREIRA et al., 1993).

No Brasil a beterraba é uma das principais hortaliças cultivadas ocupando a 12^a posição, sendo que nas últimas décadas, a área cultivada com essa hortaliça tuberosa apresentou grande aumento, sobretudo no Sudeste, onde se encontram 42% das propriedades produtoras (FONTES, 2005). No Paraná a área plantada é de 3.527 ha, com uma produção de 92.881 toneladas (DERAL, 2015).

Apesar do grande potencial produtivo, a cultura possui algumas limitações quanto ao ataque de doenças. Entre elas, de grande importância, o tombamento de plântulas, que dificulta o processo de produção de mudas e a estabilização da cultura a campo na fase inicial. O tombamento de plântulas ou também denominado “damping-off” é um dos maiores problemas das doenças de plantas, o seu controle ou prevenção é dificultado pelo envolvimento de muitos

patógenos que atuam isoladamente ou combinados à uma grande diversidade de espécies vegetais, podendo atingir mais de 80 culturas em casa de vegetação (STEPHENS et al., 1981).

Caracteriza-se por ser uma doença que ataca a cultura na fase de plântulas, podendo ocorrer na pré e pós-emergência. No primeiro caso, os cotilédones são atacados antes de emergirem e, no segundo os patógenos atingem a plântula já emergida. O ataque ocorre na região do colo provocando o fendilhamento e morte da plântula. Os fungos causadores do tombamento, na sua grande maioria estão presentes no solo, com atividade saprofítica ou através de estruturas de resistência. Seus propágulos são disseminados através da água de irrigação, ventos ou partículas de terra aderidas a implementos agrícolas. A penetração desses fungos se dá diretamente através das paredes celulares da epiderme da raiz ou hipocótilo com subsequente danos aos tecidos e surgimento da doença (KRUGNER, 1995).

Entre os fungos de grande importância, encontra-se o *Fusarium* sp. O gênero inclui uma série de espécies patogênicas de vegetais com importância econômica. O *Fusarium* sp. é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ou do creme à laranja), com micélio aéreo e difuso. Na fase assexuada produz esporos, que podem ser microconídios e os macroconídios. Já os estágios sexuais de *Fusarium* sp. são ascomicetos; o esporo sexual é o ascósporo. Na cultura da beterraba já foram descritos diversas espécies de *Fusarium* sp., com destaque para o *F. solani* e *F. oxysporium* (MENDES; URBEN, 2015).

No controle do tombamento, além de medidas culturais, o tratamento de sementes é o método mais empregado, sendo para isto utilizados fungicidas químicos. No entanto, considerando a grande demanda por produtos naturais, e a preocupação com a segurança ambiental, a busca por métodos alternativos de controle de fitopatógenos vêm tomando grande importância entre os pesquisadores e produtores. Nesse sentido a indução de resistência, apresenta grande importância, pois utiliza produtos bióticos ou abióticos no processo de ativação dos mecanismos de defesa das plantas contra patógenos e insetos. Estes indutores ativam uma série de genes relacionados a defesa vegetal, responsáveis pela produção de compostos antimicrobianos, bem como ativadores de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP) (DURRANT; DONG, 2004).

Entre os indutores abióticos, destaca-se a quitosana que tem demonstrado potencial para o controle de doenças em várias plantas de importância econômica. A quitosana é oriunda da quitina, sendo que a quitina é um polissacarídeo constituído por uma seqüência linear de N-acetilglucosamina, com estrutura semelhante à da celulose (SIGNINI, 2002). A quitina tem como principais fontes naturais as carapaças de crustáceos, notadamente caranguejo, camarão e

lagosta, que representam 15–20% da quitosana e tem sido proposta como material atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia, medicina e mais recentemente na agricultura.

Em termos agrícolas, a quitosana tem sido pesquisada para determinar seu potencial no aumento da tolerância de plantas a estresses (LEE et al., 1999) e na ativação de respostas de defesa, de forma a se protegerem as espécies vegetais contra microrganismos fitopatogênicos (BENHAMOU, 1996). Em pepinos, houve controle da podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, indução de respostas de defesas, incluindo a indução de barreiras estruturais nos tecidos das raízes e estímulo das hidrolases (quitinases e β -1,3-glucanase) tanto nas raízes como nas folhas, além de não ter causado fitotoxicidade na planta (GHAOUTH et al., 1994).

Em tratamento de sementes, existem poucas pesquisas, entre elas a desenvolvida por Freddo et al. (2012), que observaram que a aplicação de quitosana em sementes de acácia, foram favoráveis à emergência e ao desenvolvimento das plântulas. Pastucha (2008) verificou que a quitosana quando aplicada nas sementes, e no início da antese foi mais eficiente em inibir infecções na soja em comparação com a aplicação da quitosana apenas no período de desenvolvimento da soja. O trabalho sugere que estas aplicações protegem as sementes germinadas das infecções por fungos do solo.

Considerando a importância do tombamento de plântulas em beterraba, o potencial da quitosana como indutor de resistência, a necessidade de pesquisas para buscar métodos alternativos e a inexistência de trabalhos que avaliaram a quitosana no tratamento de sementes de beterraba, este trabalho apresenta a pesquisa desenvolvida com o objetivo de avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência a plântulas de beterraba e no controle de *Fusarium* sp. *in vitro*.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A etapa de cultivo foi conduzida em uma câmara controlada (sistema fitotron), instalada no Laboratório de Fisiologia Vegetal e o crescimento micelial no Laboratório de Fitopatologia na mesma Instituição, no ano de 2014. As sementes utilizadas no experimento foram oriundas do estado do Rio Grande do Sul, da empresa Isla[®]. As variedades são beterraba Maravilha (50g) com 99% de poder de germinação, sem adição de agrotóxicos. As soluções de quitosana foram preparadas com material oriundo de farmácia de manipulação, com 98% de pureza do produto, a qual foi diluída em solução contendo ácido acético a 1%, ajustadas

as concentrações com água destilada (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%). O tratamento das sementes foi realizado, com imersão em solução de quitosana por 20 minutos, sendo para testemunha somente água destilada. Em seguida foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo o substrato Plantamax Florestal[®] previamente esterilizado e inoculado com *Fusarium* sp.. Cada repetição foi constituída por 20 células, onde cada célula recebeu uma semente tratada com o indutor. O micélio de *Fusarium* sp., foi previamente inoculado em sementes de trigo autoclavadas, sendo mantidos em incubadora B.O.D. (demanda bioquímica de Oxigênio). Essas sementes de trigo contaminadas com *Fusarium* sp., foram utilizadas como veículo contaminante ao substrato esterilizado, na proporção de 10 g.kg⁻¹. Os inóculos foram incorporados ao substrato três dias antes de receber as sementes.

As bandejas foram mantidas na câmara de cultivo, com as dimensões de 2,50 m de comprimento, 2,50 m de largura e 2,50 m de altura, com controle temperatura (25 °C ± 2 °C), luminosidade (fotoperíodo de 12 horas) e umidade (70% ± 10). Após 14 dias finalizou-se o experimento, analisando as variáveis: (i) emergência das sementes; (ii) incidência de tombamento; (iii) comprimento de plântula; e (iv) massa da matéria fresca. Nos tratamentos testemunha e na concentração de quitosana (1%) foram também quantificados, nos tecidos das plântulas, os teores das enzimas FAL, β -1,3-glucanase e quitinases, sendo que as amostras foram constituídas por 0,5 g de plantas mescladas entre todas as partes do vegetal (folhas, talo e raízes), as quais foram imediatamente, após a coleta, congeladas e armazenadas, até as avaliações.

A emergência foi avaliada considerando-se o número de plântulas emergidas, em relação ao número total da repetição (20 sementes) e os dados expressos em percentual de emergência. Para o percentual de tombamento foi considerado o número de plântulas que apresentaram sintomas da doença. O tamanho de plântulas foi determinado com auxílio de um paquímetro (mm). A produção de massa de matéria fresca total (parte aérea e raízes) das plântulas foi avaliada considerando o peso de massa fresca, sendo que antes das pesagens as raízes foram lavadas e a massa determinada em gramas na balança de precisão.

A determinação da atividade da FAL foi por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por KÜHN (2007), com adaptação, onde se utilizou 0,25 g da amostra macerada em 3,0 mL do tampão TRIS-HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe e centrifugado por 10 minutos, a 4 °C e em 6000 RPMs. Após, foi transferido uma alíquota de 200 μ L para tubo de ensaio, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada em vórtex, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro

tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, esta solução foi agitada em vórtex para homogeneização. Após isso, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40 °C. Depois de retirados deste processo, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação e assim poder ser realizada a leitura em espectrofotômetro a 290 nm.

Para dosagem das atividades de quitinase e β -1,3-glucanase seguiram-se os procedimentos descritos por Wirth e Wolf (1992), com adequações, sendo que as amostras foram maceradas em 2,0 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 “*chitin-azure*”, à partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (Sigma Aldrich®). Para determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato curdlan-remazol azul brilhante (Sigma Aldrich®) 4 mg.ml⁻¹.

O experimento de crescimento micelial foi realizado no Laboratório de Fitossanidade da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, sendo utilizadas as concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 % de quitosana, além de uma testemunha contendo somente B.D.A.. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo a unidade experimental composta por uma placa de Petri®. A quitosana foi diluída com ácido acético 1% e então, ficou por 12 horas em banho-maria à 60 °C, em seguida foi incorporada ao meio de cultura B.D.A., nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%. A seguir, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri®, em câmara de fluxo laminar. Após a solidificação do meio, foram colocados discos com 10 mm de diâmetro, contendo o micélio do *Fusarium* sp., nas placas. Posteriormente, as placas foram mantidas em B.O.D. à temperatura de 25 °C \pm 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. O crescimento micelial foi acompanhado durante 26 dias após a incubação em B.O.D, sendo finalizado neste período devido as placas de Petri® terem suas bordas atingidas pelo crescimento micelial de *Fusarium* sp..

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), e quando significativos, foram submetidos à análise de regressão, sendo adotado um nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009).

3.5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a aplicação de quitosana interferiu positivamente nos parâmetros emergência, conforme apresentado na Figura 1A, incidência de tombamento na Figura 1B e comprimento de plântulas na Figura 1C. O maior percentual de emergência ocorreu na concentração de 1% de quitosana, acima de 90% de plântulas emergidas e com menor percentual de danos por tombamento. Já na testemunha o percentual de emergência limitou-se a 65% (Figura 1A). Tais dados estão diretamente relacionados ao percentual de incidência de tombamento, sendo que na concentração de 1% foi abaixo de 10%, já na testemunha ficou em 35% (Figura 1B). Isso demonstra que as plântulas que não foram contabilizadas como germinadas apresentaram tombamento.

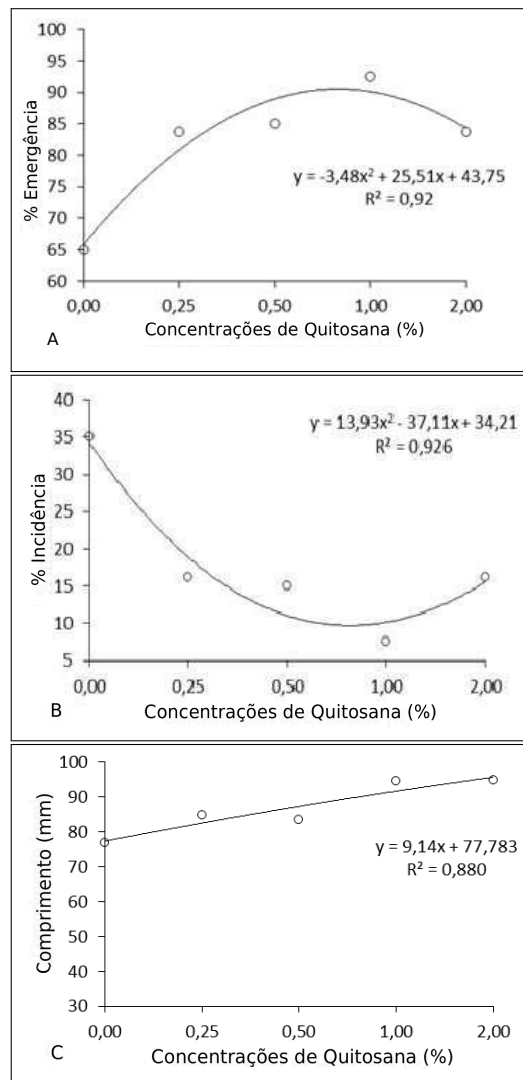


Figura 1: Emergência (A), incidência de tombamento (B) e comprimento (C) de plântulas de beterraba submetidas ao tratamento de sementes com diferentes concentrações de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014
Fonte: Autoria própria.

Tal efeito da quitosana sobre a redução da incidência de tombamento pode estar relacionado a dois fatores, o de indução de resistência e o efeito direto sobre o patógeno. Na indução de resistência a quitosana atua ativando rotas de defesa vegetal, como as fitoalexinas, a formação de compostos fenólicos, promovendo a lignificação, ativando as peroxidases, fenilalanina amônia-liase e as enzimas quitinases e β -1,3-glucanase (BAUTISTA-BANOS et al., 2006), (TERRY; JOYCE, 2004), (ZHANG; QUANTICK, 1998). Em um trabalho avaliando o efeito da quitosana na indução de resistência a *Fusarium oxysporum* em plantas de caupi, verificou-se a redução da severidade da doença e aumento da atividade da FAL e β -1,3-glucanase (RODRIGUES et al., 2006). Em trabalho desenvolvido por Freddo et al. (2012), em tratamento de sementes de acácia negra, com quitosana, nas concentrações de 0,6% a 0,9%, o tombamento foi reduzido e o desenvolvimento inicial das plântulas acelerado, bem como observou-se a ativação da FAL. Ainda, Liu et al. (2007) observaram o efeito direto sobre o patógeno atuando na redução do crescimento micelial e sobre o esporo.

Em relação ao comprimento de plântulas, mostrado na Figura 1C, a quitosana promoveu um maior crescimento das plântulas, no entanto, tal fato não resultou em um aumento da massa da matéria fresca, haja visto que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, com valor médio de massa de matéria fresca de 0,58 g/planta. Tais dados demonstram que quitosana no tratamento de sementes não causa danos as plântulas, o que poderia ser um fator desfavorável caso tivesse ocorrido efeito fitotóxico nas mesmas. Ainda, o aumento no tamanho das plântulas, pode estar relacionado a ativação por quitosana do metabolismo primário ou a alteração de algum hormônio relacionado ao crescimento vegetal, parâmetros que não foram quantificados neste trabalho. Esse estímulo, pode ter resultado no aumento do comprimento de plântulas. Outro fator importante, é a não ocorrência de perdas metabólicas para defesa vegetal, o que poderia resultar na redução do tamanho de plântulas, que, conforme afirmam Heil et al. (2000), a produção de proteínas-RP podem competir com proteínas necessárias aos processos básicos da planta, podendo comprometer o crescimento e desenvolvimento dela.

Na Figura 2, pode-se observar a atividade das enzimas quitinases, β -1,3-glucanase e FAL. Os dados mostraram que a quitosana atuou ativando as quitinases (Figura 2A) e as β -1,3-glucanase (Figura 2B). No entanto, interferiu negativamente sobre a atividade da FAL (Figura 2C).

Esse resultado comprova o efeito de quitosana na ativação da Resistência Sistêmica Adquirida. As Proteínas-RP (quitinase e β -1,3-glucanase) possuem ação direta, prevenindo a penetração de patógenos, por ação de degradação das quitinas e glucanas presentes na

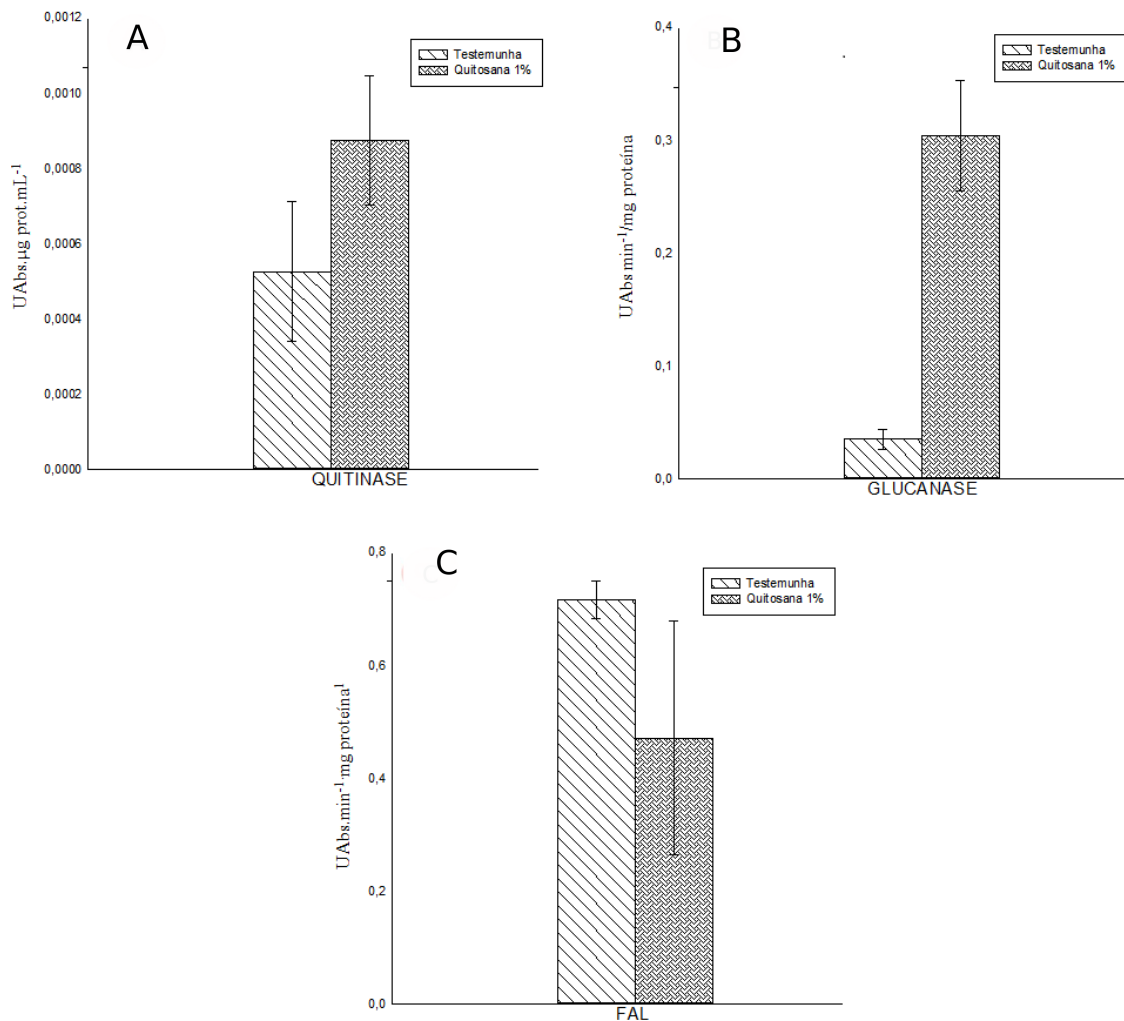


Figura 2: (A) Atividade da enzima quitinase, (B) Atividade da enzima β -1,3-glucanase, (C) Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase, a partir de plântulas de beterraba submetidas ao tratamento de sementes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014.

Fonte: Autoria própria.

parede celular dos patógenos (DURRANT; DONG, 2004). Em experimento realizado por PIERO e GARDA (2008), com quitosana avaliando o controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em feijoeiro-comum, observaram que a quitosana ativou a defesa das plantas, aumentando a atividade da enzima β -1,3-glucanase e reduzindo a severidade da antracnose. Também foi observado que com a aplicação da quitosana em feijoeiro, o metabolismo relacionado à resistência das plantas foi alterado e provocou o aumento na atividade de β -1,3-glucanase, em folhas previamente tratadas.

Em relação ao comportamento da FAL, que apresentou um valor inferior ao tratamento com quitosana, pode-se considerar que a rota metabólica de defesa vegetal seja preferencial para as PR-proteínas quitinase e β -1,3-glucanase. Em detrimento disto, ocorre uma redução

da atividade da rota dos fenilpropanóides. Ainda, existe a possibilidade de a enzima ter sido ativada, anterior ao momento da avaliação, pois a quantificação foi realizada somente no final do experimento, com 14 dias. Sugerem-se, novos estudos com avaliação do comportamento enzimático no decorrer do tempo do experimento, o que permitirá um estudo do comportamento da ativação da enzima.

Os resultados do experimento de crescimento micelial demonstraram que o aumento da concentração da quitosana resultou em uma redução do crescimento micelial de *Fusarium* sp., que pode ser observado na Figura 3.

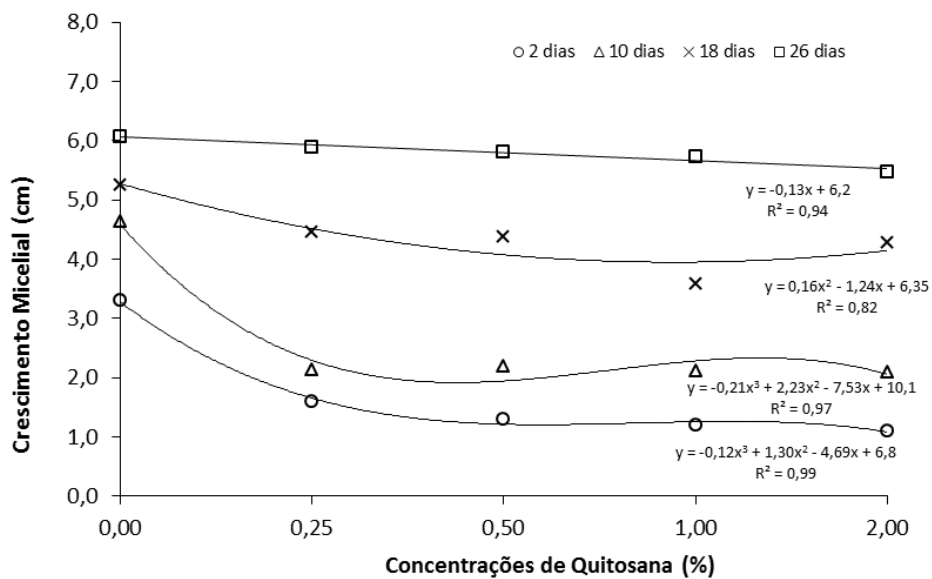


Figura 3: Crescimento micelial de *Fusarium* sp. submetidos a aplicação de concentrações crescentes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014.

Fonte: Autoria própria.

Tal efeito evidencia o potencial da quitosana na ação fungistática, o que havia sido observado por Liu et al. (2007), onde os autores trabalharam com os fitopatógenos, *B. cinerea* e *Penicillium expansum*, e verificaram que houve inibição do crescimento micelial do primeiro fungo a partir da concentração de 0,25% do polissacarídeo e redução inversamente proporcional ao aumento da concentração para o segundo patógeno. PIERO e GARDA (2008), verificaram que além da inibição do crescimento micelial nas concentrações de 1 a 5 mg mL⁻¹, a quitosana suprimiu a germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose feijão. Em trabalho realizado por Maia et al. (2010) a aplicação de quitosana na maior concentração 300 mgL⁻¹, obteve efeito fungistático sobre o fungo *E. ampelina*, demonstrando potencial de utilização no controle da antracnose da videira.

Em uma avaliação conjunta dos dados obtidos nos dois trabalhos, tanto no tratamento

de sementes, como no *in vitro*, permite-se afirmar que o emprego de quitosana no tratamento de sementes de beterraba reduz o tombamento de plântulas e que tal resultado está relacionado ao processo de indução de resistência ativando as enzimas quitinases e β -1,3-glucanase, e que ainda tal efeito no controle da doença esta associado ao seu efeito fungistático.

3.6 CONCLUSÕES

A quitosana atua na indução de resistência reduzindo o tombamento de plântulas de beterraba ativando as enzimas relacionadas a patogenicidade, as quitinases e as β -1,3-glucanases.

A quitosana atua no controle de *Fusarium* sp. *in vitro* com ação fungistática.

4 QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE PEPINO E NO CONTROLE DE *Pythium* sp. *IN VITRO*

4.1 RESUMO

O pepino é uma hortaliça com expressiva participação na produção agrícola do Brasil. Devido a necessidade de maiores rendimentos das culturas, torna-se cada vez mais comum a utilização de produtos químicos no controle das doenças. Tais produtos tornam o pepino, uma das hortaliças que aparecem com alta contaminação por agrotóxicos. Nesse sentido, métodos alternativos no controle de fitopatógenos, vêm sendo estudados e demonstrando bons resultados. Dentre estes produtos a quitosana, um indutor de resistência de origem abiótica apresenta potencial no tratamento de sementes para o controle de fitopatógenos causadores de tombamento de plântulas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e no controle de *Pythium* sp. *in vitro*. As sementes de pepino foram submersas em solução de quitosana por 20 minutos, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2% e na testemunha água destilada. As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato inoculado com *Pythium* sp., e mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h e temperatura de 25 °C ± 2°C por 14 dias. Após este período, foi avaliado a emergência das sementes, tombamento de plântulas, comprimento de plântula, massa da matéria fresca e a atividade das enzimas FAL, quitinase e β -1,3-glucanase. Foi avaliado também o crescimento micelial de *Pythium* sp. em meio de cultura B.D.A. (batata-dextrose e ágar) contendo quitosana, nas mesmas concentrações testadas nas sementes. A quitosana quando aplicada em tratamento de sementes de pepino na concentração de até 0,5% favorece a emergência das plântulas e reduz a incidência de tombamento. A quitosana ativa as enzimas FAL e β -1,3-glucanase relacionadas a defesa vegetal de plântulas de pepino. A quitosana apresenta ação fungistática sobre o crescimento inicial de *Pythium* sp. em condições *in vitro*, no entanto, tal ação não prevaleceu até o término do período avaliado.

Palavras-chave: Fenilalanina-amônia-liase. Quitinases. β -1,3-glucanase. Indutores de resistência. Fitopatógenos.

4.2 ABSTRACT

CHITOSAN IN THE INDUCTION OF RESISTANCE TO TIPPING CUCUMBER SEEDLINGS AND CONTROL OF *Pythium* sp. IN VITRO

Cucumber is a vegetable with a significant share of agricultural production in Brazil. Due to the need for higher crop yields increasingly it becomes common to use chemicals in disease control. Such products make cucumber, one of the vegetables that appear with high contamination by pesticides. In this sense, alternative methods to control plant pathogens, have been studied and shown to work elsewhere. Among these products chitosan an abiotic origin of resistance inducer has potential for seed treatment for the control of plant pathogens causing seedling damping-off. The objective of this study was to evaluate the potential of chitosan in the induction of resistance to tipping cucumber seedlings (*Cucumis sativus*) and in control of *Pythium* sp. in vitro. The cucumber seeds were submerged in chitosan solution for 20 minutes in concentrations of 0.25; 0.5; 1.0; 2.0% and distilled water in control. The seeds were sown in polystyrene trays containing substrate inoculated with *Pythium* sp., And maintained in a growth chamber with a photoperiod of 12 h and a temperature of 25 °C ± 2°C for 14 days. After this period, it was evaluated seed germination, seedling damping-off, seedling length, fresh weight and the activity of enzymes PAL, chitinase and β -1,3-glucanase. It was also rated the mycelial growth of *Pythium* sp. in culture medium PDA (potato-dextrose and agar) containing chitosan at the same concentrations tested in seeds. Chitosan when applied in treatment of cucumber seeds in the concentration of up to 0.5% favors the emergence of seedlings and reduces the incidence of tipping. The active chitosan the PAL enzymes and β -1,3-glucanase relacionadass the plant defense cucumber seedlings. Chitosan has fungistatic action on the initial growth of *Pythium* sp. in vitro conditions, however, such action did not prevail until the end of the study period.

Keywords: Phenylalanine ammonia-lyase. Chitinases. β -1,3-glucanase. Resistance inducers. Plant pathogens.

4.3 INTRODUÇÃO

O pepineiro é cultivado em praticamente todos os países, principalmente pelo valor alimentício de seus frutos (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1999). No Brasil, as cultivares de pepino são divididas em pepino de salada que é subdividido em: pepino Aodai, caipira e japonês (LOPES et al., 1999). No Estado de São Paulo predominam atualmente, híbridos do tipo japonês, que vêm ocupando cada vez mais espaço no Brasil. Pois os frutos são caracterizados por sua alta qualidade e palatabilidade, sendo o fruto preferido em mercados exigentes, como o

da capital paulista (CARDOSO, 2007).

O pepino é bastante apreciado e consumido sob a forma de fruto imaturo em saladas, curtido em salmoura ou vinagre (CARDOSO; SILVA, 2003). O pepineiro é a segunda cucurbitácea mais plantada no mundo, ficando atrás apenas da melancia. Seu cultivo data cerca de 3.000 anos entre a Índia e o Nepal, constituído em uma importante fonte de alimento (FONTES, 2005). Essa cultura é suscetível a diversas doenças causadas por patógenos de solo como a mancha de leandria (*Leandria momordicae* Rangel) e a mais comum, tombamento de plântulas causado por *Pythium* sp. resultando em uma podridão que leva à morte das plantas recém-emersas. Geralmente isto ocorre duas semanas após a semeadura, quando as plantas estão mais suscetíveis ao seu ataque, tendo-se influência da alta umidade e de temperaturas amenas (FILHO et al., 2005).

O controle de tombamento pode ser feito com medidas culturais ou tratamento químico com fungicidas. No entanto, considerando-se a grande demanda por produtos naturais, cresce cada vez mais a busca por métodos alternativos de controle de fitopatógenos. Nesse sentido a indução de resistência, apresenta grande importância, pois utiliza elicitores bióticos ou abióticos no processo de ativação dos mecanismos de defesa das plantas contra patógenos e insetos (STICHER et al., 1997). Os eliciadores podem atuar de diferentes formas, porém, sempre levando a ativação do sistema de defesa das plantas. A quitosana tem demonstrado potencial para o controle de doenças em várias plantas de importância econômica. Essa substância é um polímero policatiônico β -1,4 ligado a D-glucosamina definido como um diacetilato de quitina, sendo um polissacarídeo natural extraído da casca ou exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo, lagosta e de plantas como as algas marinhas e da parede celular de alguns fungos (KHOR, 2001).

Alguns trabalhos desenvolvidos no tratamento de sementes demonstraram o potencial de quitosana no controle de fitopatógenos de solo, causadores de tombamento, como no tratamento de sementes de tomate e beterraba, onde aplicações de quitosana a 1,1 a 2,5% reduziram o tombamento de plântulas e ativaram a enzima FAL (MAZARO et al., 2009). Em plântulas de eucalipto a utilização de quitosana no tratamento das sementes de *E. saligna* mostraram características positivas diminuindo tombamento de plântulas. As concentrações de quitosana entre 0,6% e 0,9% são recomendadas para aplicação nas sementes de *Acacia mearnsii* de forma a reduzir o tombamento e acelerar o desenvolvimento inicial das plântulas (FREDDO et al., 2012).

Em pimenta, o uso de quitosana sobre *Botrytis cinerea* causou severos danos citológicos à hifa, inibindo a habilidade do patógeno de colonizar os tecidos (GHAOUTH

et al., 1997). Ainda em testes *in vitro* constatou-se que a quitosana inibiu o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em frutos de tomate. A redução na incidência e severidade do mofo cinzento causado por *B. cinerea* em uvas cvs. “Thompson Seedless”, “Autumn Black” e “Emperor” também foram verificadas em tratamentos com quitosana a 1% (ROMANAZZI et al., 2006). Apesar da existência de diversos trabalhos que relacionam o uso de quitosana no tratamento de sementes, em pepino tais estudos ainda não foram realizados. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de pepino e no controle de *Pythium* sp. *in vitro*.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos, sendo a etapa de cultivo conduzida em uma câmara controlada (sistema fitotron), instalada no Laboratório de Fitopatologia Vegetal e o crescimento micelial no laboratório de Fitossanidade, na mesma Instituição, no ano de 2014. As sementes foram oriundas do estado do Rio Grande do Sul, da empresa Isla[®]. A variedade de pepino utilizada foi a Wisconsin SMR 18 (50g), com 99% de poder de germinação, sem adição de agrotóxicos.

As soluções de quitosana foram preparadas com material oriundo de farmácia de manipulação, com 98% de pureza do produto, a qual foi diluída em solução contendo ácido acético a 1% e então, ajustadas as concentrações com água destilada (0,25; 0,5; 1 e 2%). O tratamento das sementes foi realizado, com imersão das mesmas em solução de quitosana por 20 minutos, sendo para testemunha somente água destilada. Em seguida foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo o substrato Plantmax Florestal[®] previamente esterilizado e inoculado com *Pythium* sp.. Cada repetição foi constituída por 20 células, onde cada célula recebeu uma semente tratada com o indutor. O micélio de *Pythium* sp., foi previamente inoculado em sementes de trigo autoclavadas, sendo mantidos em incubadora B.O.D. Essas sementes de trigo contaminadas com *Pythium* sp., foram utilizadas como veículo contaminante ao substrato esterilizado, na proporção de 10 g.kg⁻¹. Os inóculos foram incorporados ao substrato três dias antes de receber as sementes.

As bandejas foram mantidas na câmara de cultivo, com as dimensões de 2,50 m de comprimento, 2,50 m de largura e 2,50 m de altura, com controle de temperatura (25 °C ± 2 °C), luminosidade (fotoperíodo de 12 horas) e umidade (70% ± 10). Após 14 dias finalizou-se o experimento, analisando a emergência das plântulas, incidência de tombamento, comprimento

de plântula e massa da matéria fresca. Nos tratamentos testemunha e na concentração de quitosana (0,25%) foram também quantificados nos tecidos das plântulas os teores das enzimas FAL, β -1,3-glucanase e quitinases, sendo que as amostras foram constituídas por 0,5 g de plantas mescladas entre todas as partes do vegetal (folhas, talo e raízes).

A emergência foi avaliada considerando-se o número de plântulas emergidas, em relação ao número total da repetição (20 sementes), e os dados expressos em percentual de emergência. Para o percentual de tombamento foi considerado o número de plântulas que apresentaram sintomas da doença. O tamanho de plântulas foi determinado com auxílio de um paquímetro (mm). A produção de massa de matéria fresca total (parte aérea e raízes) das plântulas foi avaliada considerando o peso de massa fresca, sendo que antes das pesagens as raízes foram lavadas e a massa determinada em gramas em uma balança de precisão.

A determinação da atividade da FAL foi por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por KÜHN (2007), com adaptações, onde se utilizou 0,25 g da amostra macerada em 3,0 mL do tampão TRIS-HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe e centrifugado por 10 minutos, a 4 °C em 6000 RPMs. Após, foi transferido uma alíquota de 200 μ L para tubo de ensaio, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada em vórtex, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, esta solução foi agitada em vórtex para homogeneização. Após isso, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40 °C. Depois de retirados deste processo, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação para poder realizar a leitura em espectrofotômetro a 290 nm.

Para dosagem das atividades de quitinase e β -1,3-glucanase seguiram-se os procedimentos descritos por Wirth e Wolf (1992), com adequações, sendo que as amostras foram maceradas em 2,0 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 oligômeros solúveis de “*chitin-azure*”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta 5R -RBV (Sigma Aldrich®). Para determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato curdlan-remazol azul brilhante (Sigma Aldrich®) 4 mg.ml⁻¹.

O experimento de crescimento micelial foi realizado no laboratório Fitopatologia da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, sendo utilizadas as concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% de

quitosana, além de uma testemunha contendo B.D.A.. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo a unidade experimental composta por uma placa de Petri[®]. A quitosana foi diluída com ácido acético 1% e então ficou por 12 horas em banho maria à 60 °C e, em seguida, foi incorporada ao meio de cultura B.D.A., nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%. A seguir, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri[®], em câmara de fluxo laminar. Após a solidificação do meio, foram colocados discos com 10 mm de diâmetro, contendo o micélio do *Pythium* sp. nas placas, com as respectivas concentrações do indutor. Posteriormente, as placas foram mantidas em B.O.D. à temperatura de 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. O crescimento micelial foi acompanhado durante 14 dias após a incubação em B.O.D., sendo finalizado neste período devido às placas de Petri[®] terem suas bordas atingidas pelo crescimento micelial de *Pythium* sp..

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e quando significativos, foram submetidos a análise de regressão, sendo adotado um nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009).

4.5 RESULTADO E DISCUSSÃO

A Figura 4 apresenta os resultados da emergência de sementes de pepino submetidas ao tratamento com quitosana. O uso da quitosana, em todas as concentrações, melhorou a emergência das plântulas, com destaque para 0,25% de quitosana, onde o percentual atingiu 100%.

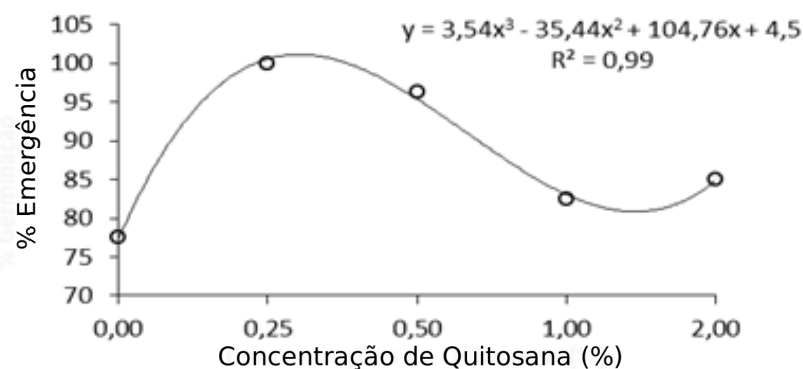


Figura 4: Emergência de sementes de pepino submetidas ao tratamento com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

Considerando os resultados em relação a emergência de plântulas, observou-se que a quitosana não apresentou efeito fitotóxico sobre o processo emergencial. A informação é importante, considerando que, havendo um efeito inibitório na emergência, poderia limitar o

uso do produto como indutor de resistência no tratamento de sementes de pepino. Haja visto que a quitosana pode interferir diretamente no desenvolvimento do patógeno ou ativar respostas de defesa no tecido vegetal, podendo interferir no processo de crescimento vegetal (AGRAWAL et al., 2002). Em experimento realizado por TANADA-PALMU et al. (2005) estudando o recobrimento de sementes de brócolis com coberturas de quitosana, relataram que a qualidade em termos de emergência e vigor não foi afetada.

A Figura 5 apresenta a incidência de tombamento. Os dados demonstraram que a quitosana nas concentrações de 0,25% até 1% apresentou efeito no processo de redução da incidência de tombamento, com destaque para a concentração de 0,5%. Acredita-se que o resultado está relacionado à indução de resistência e ao efeito direto sobre o patógeno, fato observado nesse trabalho. Na planta, a quitosana pode atuar na indução de resistência, inibindo as proteinases, alterando-se o metabolismo das fitoalexinas, promovendo a lignificação (TERRY; JOYCE, 2004); induzindo a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BANOS et al., 2006); ativando as enzimas quitinases e β -1,3-glucanase (GHAOUTH et al., 1992), (ZHANG; QUANTICK, 1998); fenilalanina amônia-liase (ROMANAZZI et al., 2002) e peroxidase (ZHANG; QUANTICK, 1997).

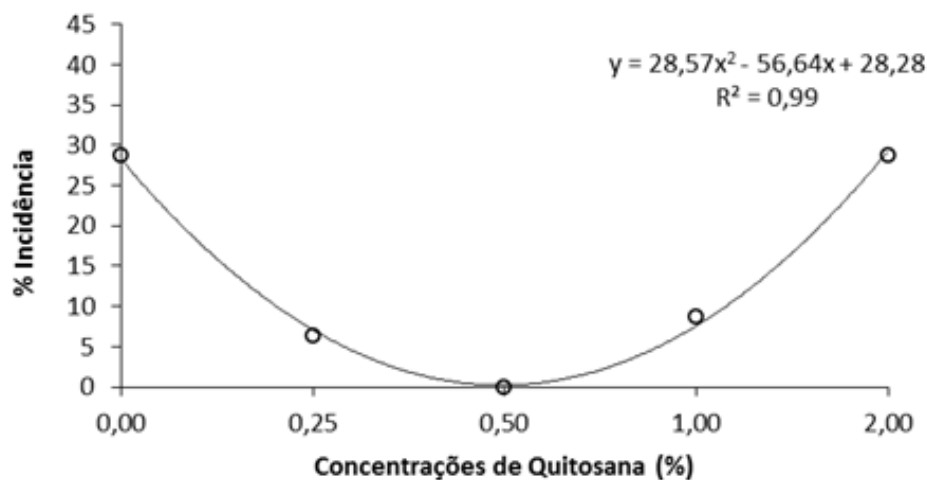


Figura 5: Incidência de tombamento de plântulas de pepino submetidas ao tratamento de sementes com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

Em relação ao comprimento de plântulas, na Figura 6, observa-se que o aumento da concentração de quitosana na semente diminuiu de forma linear o comprimento de plântulas. No entanto, tal redução nas menores concentrações até 0,5% não comprometeu a qualidade agrônômica das plântulas, haja visto que a redução máxima foi inferior a 20 mm. Porém, tal resultado sugere que ocorreu um desvio de rota metabólica para ativação dos mecanismos de indução de resistência (HEIL et al., 2000). A perda metabólica ocorre principalmente

pela utilização dos substratos eritrose-3-fosfato do ciclo das pentoses, ou fosfoenolpiruvato da glicólise na rota dos fenilpropanóides, sendo esta uma das principais rotas de defesa vegetal, e, com isso, tais substratos deixam de ser utilizados no processo de crescimento vegetal. Em trabalho realizado por Maia et al. (2010), a aplicação de quitosana no comprimento médio da parte aérea em plântulas de videira cv. Merlot, causou um decréscimo linear em função das doses de quitosana com a concentração de 200 mg L^{-1}

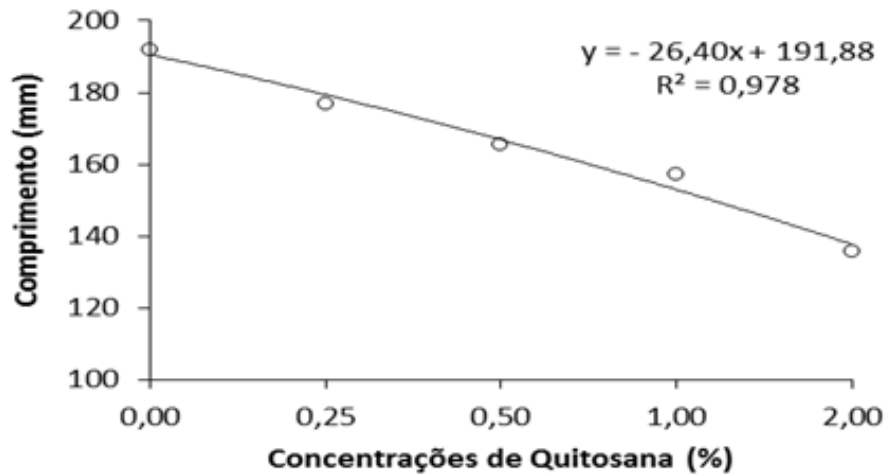


Figura 6: Comprimento de plântulas de pepino submetidas ao tratamento de sementes com quitosana e a inoculação de *Pythium* sp.. Dois Vizinhos - PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

Para a variável perda de massa da matéria fresca entre os tratamentos não ocorreu diferença significativa em função do tratamento de sementes com quitosana sendo que a média manteve-se em $0,46 \text{ g/plântula}$. Em experimento realizado por Mazaro et al. (2009) com aplicação de quitosana em tomateiro, observou-se que houve maior ganho de massa de matéria fresca e maior desenvolvimento da parte aérea e redução da incidência de tombamento, quando se utilizou a quitosana, em concentrações acima de 2%. Os mesmos autores observaram em beterraba uma maior produção de massa de matéria fresca quando as sementes foram tratadas com concentrações de quitosana acima de 0,5%.

Nas Figuras 7A, 7B e 7C, foi possível observar que a aplicação de quitosana na semente de pepino ativou as enzimas FAL e β -1,3-glucanase. Já para quitinase não ocorreu interferência em função dos tratamentos. Tais resultados comprovaram que a quitosana atua na indução de resistência em plântulas de pepino, quando ocorre o tratamento de sementes. Os dados demonstram que o processo de redução da incidência de tombamento provavelmente seja resultado da ação dessas enzimas na ativação de compostos de defesa vegetal, pela ativação da FAL, ou pela ação da β -1,3-glucanase sobre os patógenos. Quitosana atua na indução de resistência, de forma preferencial ativando a β -1,3-glucanase. Deve-se ressaltar que o

polissacarídeo β -1,3-glucano é um componente importante na parede celular de muitos fungos, que são substratos para a β -1,3-glucanase (WESSELS; SIETSMA, 1981).

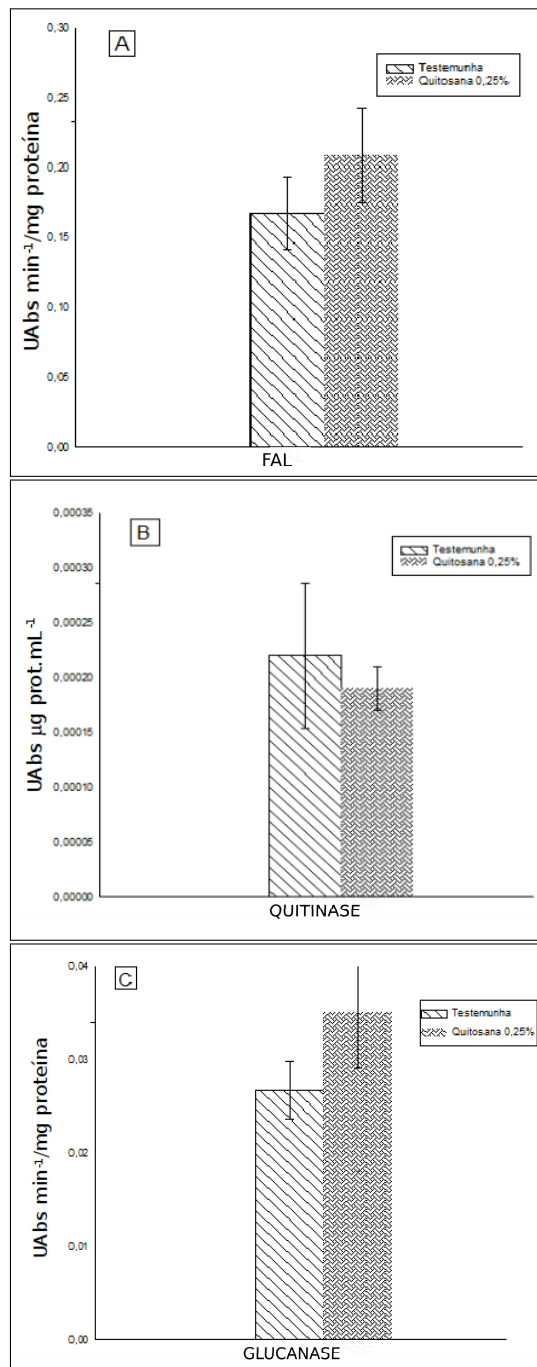


Figura 7: Atividade das enzimas FAL (A), quitinase (B), β -1,3-glucanase (C) a partir de plântulas de pepino submetidas ao tratamento de sementes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

Em trabalhos avaliando o controle da antracnose em feijoeiro-comum utilizando quitosana, observaram diferença na resposta da planta em relação ao intervalo de tempo entre a aplicação da quitosana e a inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. A aplicação

da quitosana em um intervalo maior antes da inoculação mostrou ser mais efetiva em reduzir a severidade da antracnose e induzir o sistema de defesa da planta. A quitosana promoveu o aumento na atividade da enzima β -1,3-glucanase, que atua diretamente nas glucanas presentes na parede celular do fungo fitopatogênico inibindo o seu desenvolvimento (PIERO; GARDA, 2008). Em trabalho realizado com cultivar de alface foi comprovada, “*in vitro*”, a inibição do fitopatógeno *Pythium*, quando aplicada a quitosana nas maiores concentrações, sendo obtidos os melhores resultados com concentração a partir de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, especialmente com adição de 2 mg mL^{-1} .

Os resultados do experimento de crescimento micelial apresentado na Figura 8, demonstra que a aplicação de quitosana no meio de cultura reduziu o crescimento micelial na fase inicial do desenvolvimento do patógeno, ou seja, com 2 dias de avaliação. No entanto, este fator não foi observado nas avaliações aos 6, 10 e 14 dias, onde não houve diferença significativa em relação ao crescimento micelial. Muitas vezes os indutores de resistência não atuam diretamente sobre o patógeno, apresentando efeito apenas na ativação das defesas naturais das plantas (KUC, 2001). Em suspensão de quitosana apresentou efeito antibiótico contra *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão-amarga da macieira, e reduziu a severidade da doença nos frutos imersos na suspensão (FELIPINI; PIERO, 2009).

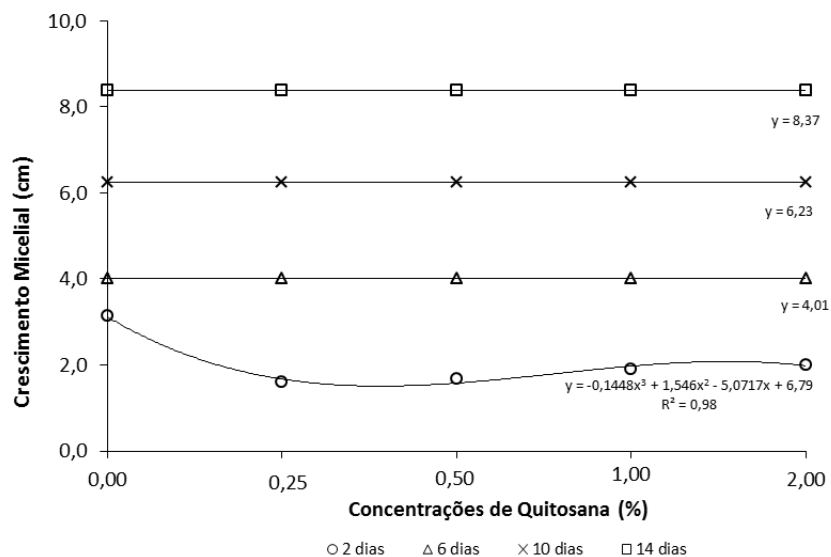


Figura 8: Crescimento micelial de *Pythium* sp. submetidos a aplicação de concentrações crescentes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

4.6 CONCLUSÕES

O tratamento de sementes de pepino com quitosana na concentração de até 0,5% favorece a emergência das plântulas e reduz a incidência de tombamento.

A quitosana, quando aplicada em tratamento de sementes de pepino, ativa as enzimas FAL e β -1,3-glucanase relacionadas a defesa vegetal.

A quitosana apresenta ação fungistática sobre o crescimento inicial de *Pythium* sp. em condições do crescimento micelial.

5 QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE TOMATE E NO CONTROLE DE *Rhizoctonia solani* Kühn IN VITRO

5.1 RESUMO

A cultura do tomate apresenta alta suscetibilidade a diversas doenças durante seu cultivo, sendo que no período de desenvolvimento das mudas, o tombamento de plântula causa grandes prejuízos. A quitosana é obtida a partir da quitina, a qual é encontrada em fungos, insetos entre outros organismos vivos, e vem demonstrando potencial na indução de resistência. Objetivou-se neste trabalho avaliar diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de tomateiro e no controle de *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. As sementes de tomate foram submersas em solução de quitosana por 20 minutos, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2% e na testemunha, água destilada. As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato inoculado com *R. solani*, e mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h e temperatura de 25 °C ± 2°C por 14 dias. Após este período, foi avaliado o comprimento de plântula, emergência das sementes, massa da matéria fresca e a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), quitinase e β -1,3-glucanase. Foi avaliado também o crescimento micelial de *R. solani* em meio de cultura B.D.A. (batata-dextrose e ágar) contendo quitosana, nas mesmas concentrações testadas nas sementes. A quitosana quando aplicada em tratamento de sementes de tomate na concentração de até 0,25% favorece a emergência das plântulas, reduz a incidência de tombamento e ativa as enzimas FAL, quitinases e β -1,3-glucanase relacionadas a defesa vegetal. A quitosana apresenta ação fungistática sobre o crescimento inicial de *R. solani* em condições *in vitro*.

Palavras-chave: Fenilalanina-amônia-liase. Quitinases. β -1,3-glucanase.

5.2 ABSTRACT

CHITOSAN ON RESISTANCE INDUCTION TO TOMATO SEEDLING TIPPING AND CONTROL *Rhizoctonia solani* Kuhn IN VITRO

The culture of tomato has a high susceptibility to various diseases during cultivation, and in the period of development of seedlings, seedling damping-off causes major damage. Chitosan is obtained from chitin which is found in fungi, insects, and other living organisms, and has demonstrated the potential induction of resistance. The aim of this study was to evaluate different chitosan concentrations in the induction of resistance to tomato seedling damping and control of *Rhizoctonia solani* Kühn in vitro. The tomato seeds were submerged in chitosan solution for 20 minutes, in concentrations of 0.25; 0.5; 1 and 2% and in distilled water in control. The seeds were sown in polystyrene trays containing substrate inoculated with *R. solani*, and maintained in a growth chamber with a photoperiod of 12 h and a temperature of $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 14 days, after this period we evaluated the length of seedling, germination seeds, fresh weight and activity of the enzyme PAL, chitinase and β -1,3-glucanase. It was also rated the mycelial growth of *R. solani* on culture medium PDA (potato-dextrose and agar) containing chitosan at the same concentrations tested in seeds. Chitosan when applied in treatment of tomato seeds in concentration of 0.25% favor seedling emergence reduces the incidence of tipping and activates the FAL enzymes, chitinase and β -1,3-glucanase relacionadas plant defense. Chitosan has fungistatic action on the initial growth of *R. solani* in vitro conditions.

Keywords: Phenylalanine ammonia-lyase. Chitinases. β -1,3-glucanase.

5.3 INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma espécie olerícola amplamente difundida em todos os estados brasileiros, sendo a segunda mais cultivada em área no país, superada somente pela batata-inglesa (*Solanum tuberosum*). A produção brasileira de tomate está concentrada nas regiões Sudeste (37,74%) e Centro-oeste (33,8%). No Brasil, na safra 2011, os estados com maior produção foram: Goiás (32,56%), São Paulo (19,53%), Minas Gerais (10,16 %), Paraná (7,85%) e Bahia (7,67%) (IBGE, 2014). A produção de tomate para o processamento concentra-se nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco, com destaque para Goiás, que detém a maior produção nacional – cerca de 70% (MELO, 2012).

Anualmente várias toneladas de tomate são deixadas de produzir devido a danos causados por doenças, sendo que nos estágios iniciais da cultura a doença que mais causa perdas na produção é o tombamento de plântulas, dificultando o processo de produção de mudas e a estabilização da cultura no início do seu desenvolvimento (NUEZ, 2001). O tombamento ou “damping-off” é considerado um dos maiores problemas das doenças de plantas, porém, o seu controle ou prevenção é dificultado pelo envolvimento de muitos patógenos que atuam isoladamente ou combinados (STEPHENS et al., 1981). A doença caracteriza-se por atacar a

cultura na fase de plântula, podendo ocorrer na pré e pós-emergência (KRUGNER, 1995). A doença causa lesões deprimidas nos tecidos vegetais jovens que provocam o tombamento da muda, podendo ocorrer antes da emergência da planta, caracterizando uma redução no estande de semeadura, nesse caso diz-se que ocorreu “damping-off” de pré-emergência (KÜHN, 2007), (SILVA et al., 2008).

Dentre os fungos que causam tombamento de plântulas, a *Rhizoctonia solani* Kühn tem importância destacada, pois pode atacar os brotos durante a emergência ou infectar sementes e tubérculos. Causa retardamento da emergência e morte da planta, resultando em menor estande, desenvolvimento irregular das plantas e conseqüente redução na produção (DIAS; IAMAUTI, 1997). Dentre os métodos de controle alternativo, cada vez mais tem se destacado o uso de indutores de resistência para controle de doenças de plantas. A indução de resistência é a ativação de um estado de resistência contra doenças, sendo este induzido sistemicamente em plantas pela utilização de agentes externos bióticos ou abióticos, sem nenhuma alteração do genoma da planta, sendo estes chamados de elicitores (STADNIK, 2000), (HAMMERSCHMIDT et al., 2001). Entre os indutores de resistência que vêm sendo avaliados na agricultura pode-se citar a quitosana, a qual vem demonstrando potencial pela sua atividade de indução de resistência sobre uma grande variedade de fitopatógenos (GHAOUTH et al., 1992), (GHAOUTH et al., 1997), (DEVLIEGHIERE et al., 2004), (PEREIRA et al., 2018).

Em tratamentos de sementes de tomate e beterraba com quitosana, Mazaro et al. (2009), observaram potencial dos tratamentos na redução da incidência de tombamento na concentração de 2,5%. Já em tratamentos de sementes de acácia *Acacia mearnsii*, trabalho realizado por Freddo et al. (2012), observaram que as concentrações de quitosana entre 0,6% e 0,9% são recomendadas para aplicação nas sementes de forma a reduzir o tombamento e acelerar o desenvolvimento inicial das plântulas. Ainda observaram que a quitosana demonstra capacidade de alteração do teor de proteínas dos tecidos vegetais das plântulas e da capacidade de ativação da enzima FAL. Em estudo realizados por Freddo et al. (2014), com a quitosana *R. solani*, em condições *in vitro*, demonstram ação fungistática, e sugeriram estudos futuros, no sentido de se averiguar a eficácia da aplicação de quitosana no controle de *R. solani* em campo.

O objetivo deste capítulo foi avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência a plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e no controle de *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos, sendo a etapa de cultivo conduzida em uma câmara controlada (sistema fitotron), instalada no Laboratório de Fitopatologia Vegetal e o crescimento micelial no laboratório de Fitossanidade, no ano de 2014. As sementes de tomate Santa Cruz Salada Paulista (50g), com 99% de poder de germinação foram oriundas do estado do Rio Grande do Sul, da empresa Isla[®], sendo isentas de tratamento de sementes.

As soluções de quitosana foram preparadas com material oriundo de farmácia de manipulação, com 98% de pureza do produto, a qual foi diluída em solução contendo ácido acético a 1% e então, ajustadas as concentrações com água destilada (0,25; 0,5; 1 e 2%). O tratamento das sementes foi realizado, com imersão das mesmas em solução de quitosana por 20 minutos, sendo para testemunha somente água destilada. Em seguida foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo o substrato Plantmax Florestal[®] previamente esterilizado e inoculado com *R. solani*. Cada repetição foi constituída por 20 células, onde cada célula recebeu uma semente tratada com o indutor. O micélio de *R. solani*, foi previamente inoculado em sementes de trigo autoclavadas, sendo mantidos em incubadora B.O.D. Essas sementes de trigo contaminadas com *R. solani*, foram utilizadas como veículo contaminante ao substrato esterilizado, na proporção de 10 g.kg⁻¹. Os inóculos foram incorporados ao substrato três dias antes de receber as sementes.

As bandejas foram mantidas na câmara de cultivo, com as dimensões de 2,50 m de comprimento, 2,50 m de largura e 2,50 m de altura, com controle de temperatura (25°C ± 2°C), luminosidade (fotoperíodo de 12 horas) e umidade (70% ± 10). Após 14 dias finalizou-se o experimento, analisando as variáveis emergidas das plântulas, incidência de tombamento, comprimento de plântula e massa da matéria fresca. Nos tratamentos testemunha e na concentração de quitosana (0,25%) foram também quantificados nos tecidos das plântulas os teores das enzimas FAL, β -1,3-glucanase e quitinases, sendo que as amostras foram constituídas por 0,5 g de plantas mescladas entre todas as partes do vegetal (folhas, talo e raízes), as quais foram imediatamente após a coleta, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até as avaliações.

A emergência foi avaliada considerando-se o número de plântulas emergidas, em relação ao número total da repetição (20 sementes), e os dados expressos em percentual de emergência. Para o percentual de tombamento foi considerado o número de plântulas que apresentaram sintomas da doença. O tamanho de plântulas foi determinado com auxílio de

um paquímetro (mm). A produção de massa de matéria fresca total (parte aérea e raízes) das plântulas foi avaliada considerando o peso de massa fresca, sendo que antes das pesagens as raízes foram lavadas e a massa determinada em gramas em uma balança de precisão.

A determinação da atividade da FAL foi por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por KÜHN (2007), com adaptações, onde se utilizou 0,25 g da amostra macerada com mais 3,0 mL do tampão TRIS-HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe e centrifugado por 10 minutos, a 4 °C em 6000 RPMs. Após, foi transferido uma alíquota de 200 μ L para tubo de ensaio, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada em vórtex, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, esta solução foi agitada em vórtex para homogeneização. Após isso, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40 °C. Depois de retirados deste processo, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação para poder realizar a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. Para a dosagem das atividades de quitinase e β -1,3-glucanase seguiram-se os procedimentos descritos por Wirth e Wolf (1992), com adequações, sendo que as amostras foram maceradas em 2,0 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 oligômeros solúveis de “*chitin-azure*”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta 5R -RBV (Sigma Aldrich®). Para determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato curdlan-remazol azul brilhante (Sigma Aldrich®) 4 mg.ml⁻¹.

O experimento de crescimento micelial foi realizado no laboratório Fitopatologia da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, sendo utilizadas as concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% de quitosana, além de uma testemunha contendo somente B.D.A.. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo a unidade experimental composta por uma placa de Petri®. A quitosana foi diluída com ácido acético 1% e então ficou por 12 horas em banho maria à 60 °C e, em seguida, foi incorporada ao meio de cultura B.D.A., nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%.

A seguir, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri®, em câmara de fluxo laminar. Após a solidificação do meio, foram colocados discos com 10 mm de diâmetro, contendo o micélio do *R solani*, nas placas, com as respectivas concentrações do indutor. Posteriormente, as placas foram mantidas em B.O.D. à temperatura de 25°C \pm 1°C) e

fotoperíodo de 12 horas.

O crescimento micelial foi acompanhado durante 8 dias após a incubação em B.O.D, sendo finalizado neste período devido às placas de Petri® terem suas bordas atingidas pelo crescimento micelial de *R. solani*.

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e quando significativos, foram submetidos a análise de regressão, sendo adotado um nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009).

5.5 RESULTADO E DISCUSSÃO

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos em relação à emergência nas sementes, onde é possível observar, que a aplicação de quitosana estimulou a emergência das sementes até a concentração de 0,5%, a partir da qual ocorreu redução deste percentual com a elevação das concentrações. Esse resultado é importante, pois demonstra que a aplicação da quitosana, em altas concentrações, causa efeito fitotóxico sobre o processo de emergência, já em baixas concentrações favorece este processo.

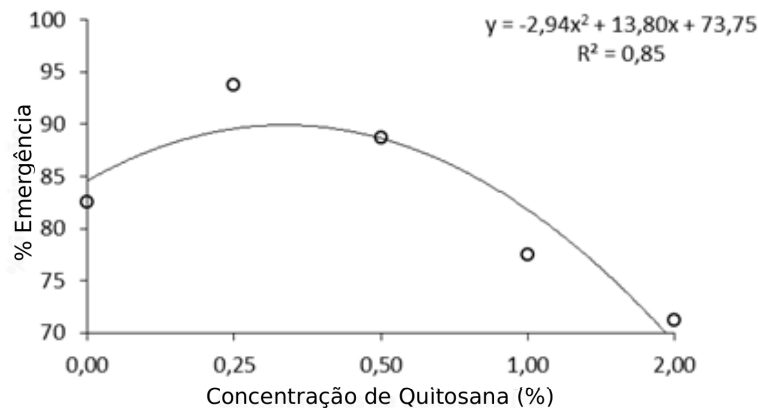


Figura 9: Emergência de sementes de tomate submetidas ao tratamento com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

Em relação ao comprimento de plântulas, na Figura 10, observa-se que o aumento das concentrações de quitosana na semente diminuiu o comprimento de plântulas, com comportamento linear decrescente em função do aumento das concentrações. Tal comportamento pode ser associado ao obtido em emergência que demonstrou que em concentrações elevadas existe um dano sobre a emergência. Já, em relação a massa de matéria fresca, não houve diferença entre os tratamentos, com médias entre os tratamentos de 0,049g./plântula. Esse efeito pode estar relacionado ao fato de que quitosana em concentrações

elevadas ative rotas metabólicas antagônicas daquelas envolvidas no processo de emergência, ou ainda, sejam ativadas rotas de defesa de forma intensa provocando perdas metabólicas, e com isso, resultando em danos na emergência e no tamanho de plântulas. Em estudo sobre o efeito da cobertura de sementes de salsa e brócolis com quitosana, TANADA-PALMU et al. (2005) descrevem que esta não afetou, em termos de capacidade de germinação e vigor em sementes de salsa e no vigor de sementes de brócolis. Em videira cv. Chardonnay a concentração quitosana de 2% de chitogel, teve um efeito negativo no crescimento das plântulas e concentrações maiores promoveram morte das mesmas (BARKA et al., 2004).

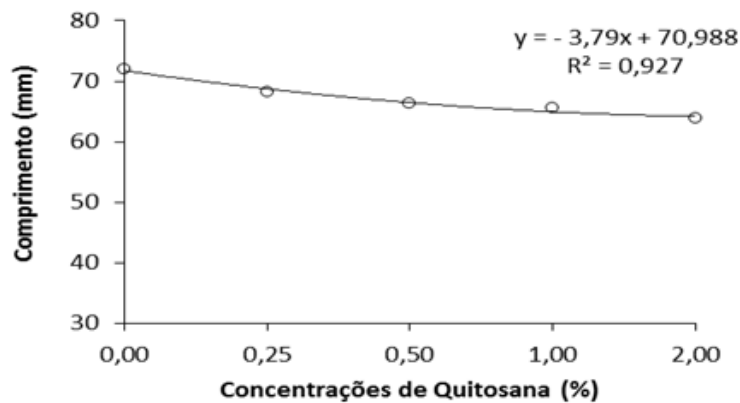


Figura 10: Comprimento de plântulas de tomate submetidas ao tratamento de sementes com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

A Figura 11 apresenta a incidência de tombamento de plântulas, onde ocorreu a aplicação de quitosana até 0,5%, reduzindo a incidência de tombamento, com destaque para 0,25%, provavelmente pela ativação dos mecanismos de indução de resistência.

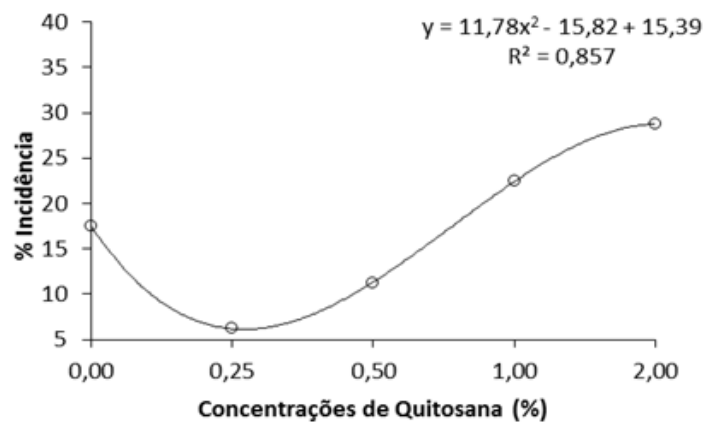


Figura 11: Incidência de tombamento de plântulas de tomate submetidas ao tratamento de sementes com quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

Resultados de indução de resistência, no controle de fungos do solo, com uso de quitosana já haviam sido observados em plantas de pepino com a indução de respostas de defesa, inclusive com formação de barreiras estruturais nos tecidos das raízes e o estímulo das hidrolases, contra a podridão das raízes causada por *Pythium aphanidermatum* (GHAOUTH et al., 1994). Em bananeiras a aplicação de quitosana reduziu o ataque do fungo *Colletotrichum musae* (NEGREIROS et al., 2013). Também no controle do fungo *Penicillium expansum* em maçãs (BRITTO; ASSIS, 2012). Quitosana apresentou efeito significativo em diferentes concentrações no controle do fungo *P. digitatum* mofo verde em citrus (COUTINHO et al., 2014).

As Figuras 12A, 12B e 12C, apresentam os resultados observados para atividade das enzimas FAL, quitinase e β -1,3-glucanase no tratamento 0,25% de quitosana em comparação com a testemunha, demonstrando que a aplicação de quitosana estimulou todas as enzimas avaliadas relacionadas à patogenicidade.

A FAL é considerada chave entre o metabolismo primário e secundária, e precursora da rota do ácido chiquímico, via fenilpropanoide, atuando na formação de ligninas, flavonóides e fitoalexinas que participam durante a interação da planta com o patógeno (KHAN et al., 2003), (DURRANT; DONG, 2004). A quitosana quando aplicada em plantas de soja, aumentou a atividade das enzimas FAL, e conseqüentemente elevou a quantidade de compostos fenólicos que estão relacionados com o fenômeno de resistência da planta a doenças (KHAN et al., 2003).

Segundo (MAZARO et al., 2009), o tratamento de sementes de tomate com quitosana, aumentou a atividade da enzima FAL, envolvida na rota metabólica de alguns compostos relacionados à defesa da planta, rota dos fenilpropanóides, antocianinas, flavonóides, taninos e resultou na redução do tombamento de plântulas de tomate causado por *Rhizoctonia solani* Kühn. Assim como para FAL, a aplicação de quitosana na concentração de 0,25% elevou a atividade das enzimas de defesa β -1,3-glucanase e quitinase, as quais atuam diretamente sobre a parede celular do fungo, prevenindo a penetração de patógenos, por ação de degradação das quitinas e glucanas presentes na parede celular dos patógenos (DURRANT; DONG, 2004). (MAZARO et al., 2009) também comprovou que a aplicação de quitosana induz a resistência em plântulas de tomateiro pela ativação das proteínas-RPs, glucanase e quitinase. Aziz et al. (2006) observaram a elevação na atividade de β -1,3-glucanase em folhas de videira e tomateiro tratadas com quitosana $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse incremento na atividade enzimática, auxiliou na proteção de videira, contra as doenças causadas por *B. cinerea* e *Plasmopara vitícola*, bem como na redução da severidade da requeima do tomate, provocada por *Phytophthora infestans* (ATIA et al., 2005). Em feijoeiro, além das β -1,3-glucanase, a quitosana demonstrou a capacidade

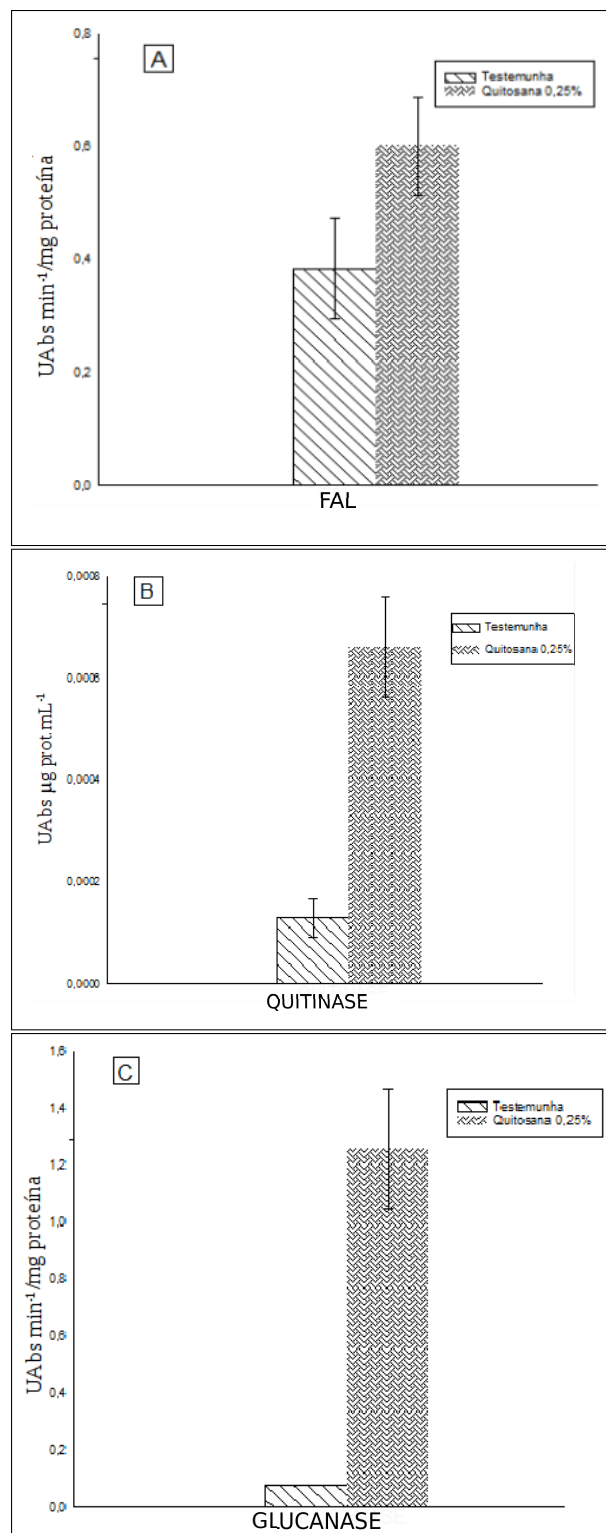


Figura 12: (A) Atividade da enzima FAL, (B) Atividade da enzima quitinase, (C) Atividade da enzima β -1,3-glucanase, a partir de plântulas de tomate submetidas ao tratamento de sementes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

de ativar respostas de defesa, como a síntese de calose, e induziu resistência contra o *Tobacco necrosis virus* (FRANCO; IRITI, 2007)

Os resultados do experimento de crescimento micelial demonstrou que a aplicação de quitosana apresentou ação fungistática sobre o crescimento inicial de *R. solani*, no entanto, tal ação não prevaleceu até o término do experimento, conforme apresentado na Figura 13. Tal ação fungistática já foi observada em algumas espécies de fungos, quando germinam na presença de quitosana, que apresentam alterações morfológicas no tubo germinativo, demonstrando haver danos às células de hifas e retardamento do crescimento micelial, sendo este efeito relacionado com a concentração do polissacarídeo (GHAOUTH et al., 1994), (LIU et al., 2007), (FELIPINI; PIERO, 2009).

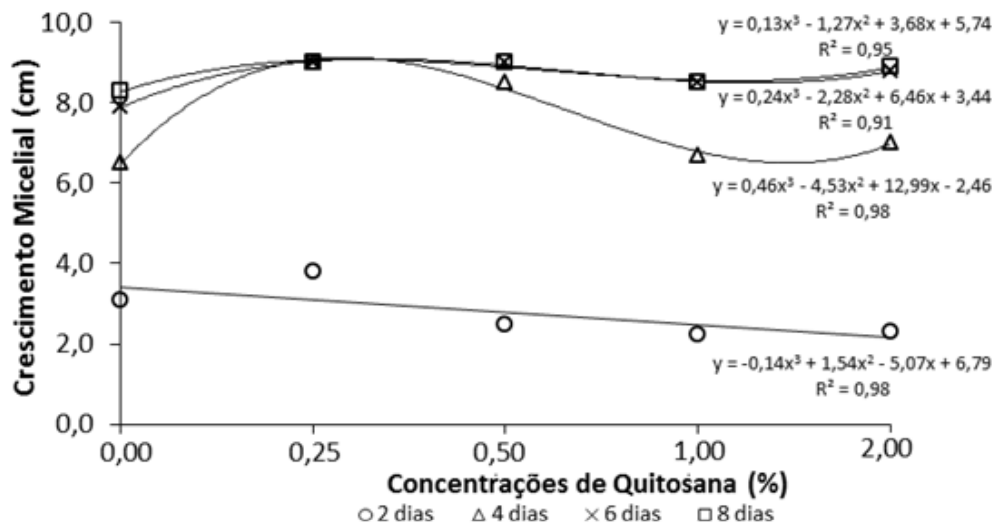


Figura 13: Crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn submetidos a aplicação de concentrações crescentes de quitosana. Dois Vizinhos-PR, 2014

Fonte: Autoria própria.

5.6 CONCLUSÕES

A quitosana quando aplicado em tratamento de sementes de tomate na concentração de 0,25% favorece a emergência das plântulas, reduz a incidência de tombamento e ativa as enzimas FAL, quitinases e β -1,3-glucanase, relacionadas a defesa vegetal.

A quitosana apresenta ação fungistática sobre o crescimento inicial de *R. solani* em condições *in vitro*, no entanto, tal ação não prevaleceu até o término do experimento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de quitosana em sementes de olerícolas como beterraba, pepino e tomate demonstrou possuir ação nos processos metabólicos, com atuação sobre as características, bioquímicas e na indução de resistência. Nesse sentido algumas considerações merecem serem apresentadas:

- A resposta da aplicação de quitosana possui especificidades para as espécies, respondendo de forma diferenciada quanto às concentrações, alterações bioquímicas e ativação das rotas metabólicas envolvidas;
- De modo geral, os resultados demonstraram que a aplicação de quitosana, para as espécies avaliadas, apresentam potencial de indução de resistência quando realizado o tratamento de sementes;
- Trabalhos futuros necessitam averiguar até quantos dias após a germinação ocorre tal indução, haja visto que tais plantas possuem outros patossistemas de interesse, e aplicações aéreas posteriores de quitosana podem ser uma alternativa de interesse no manejo de doenças.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K. et al. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of oryza sativa seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 1061–1069, 2002.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Burlington: Elsevier Academic, 2005.
- ALVES, E.; PERINA, F. J. Extratos vegetais e óleos essenciais na indução de resistência em plantas contra patógenos. **VII Reunião Brasileira de Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**, Maringá, 2014.
- AMBIENTE, M. do M. **MMA**. www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos, Acessado em 17 de março 2015.
- ANVISA. **Relatório da Anvisa indica resíduo de agrotóxicos acima do permitido**. <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/c6wa>, Acessado em 17 de março 2015.
- ANVISA, G.-G. de Toxicologia. Agência Nacional de V. S. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos - PARA: Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Brasília, 2013. 45 p.
- ATIA, M. M. et al. Antifungal activity of chitosan against phytophthora infestans and activation of defence mechanisms in tomato to late blight. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 23, n. 2, p. 175–197, 2005.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27–34, 2007.
- AZIZ, A. et al. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. **Phytopathology**, v. 96, n. 11, p. 1188–1194, 2006.
- BARKA, E. A. et al. Chitosan improves development, and protects vitis vinifera l. against botrytis cinerea. **Plant Cell Reports**, v. 22, n. 8, p. 608–614, 2004.
- BAUTISTA-BANOS, S. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 108–118, 2006.
- BEAUVÉRIE, J. Essais d'immunisation des végétaux contre les maladies cryptogamiques. **Comptes Rendus De L' académie des Sciences**, Review Genetic Botanic, v. 133, n. 1, p. 107–110, 1901.
- BEDENDO, I. P. **Damping-off**. Capítulo do livro: Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 820-828 p.
- BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 7, p. 233–240, 1996.

- BETTIOL, W. **Controle alternativo**. www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_23_299200692526.html, Acessado em 10 de fevereiro 2015.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência: noções básicas e perspectivas**. Capítulo do livro: Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba, FEALQ, 2005. 11-28 p.
- BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos de revestimento de quitosana como ativo quaternário em maçãs fatiadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 599–605, 2012.
- BROETTO, F. et al. Fungal elicitor-mediated changes in polyamine content, phenylalanine-ammonia lyase and peroxidase activities in bean cell culture. **General Applied Plant Physiology**, v. 31, n. 3-4, p. 235–246, 2005.
- CARDOSO, A. I. I. Avaliação de linhagens e híbridos experimentais de pepino do grupo varietal japonês sob ambiente protegido. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 469–475, 2007.
- CARDOSO, A. I. I.; SILVA, N. da. Avaliação de híbridos de pepino tipo japonês sob ambiente protegido em duas épocas de cultivo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 170–175, 2003.
- CASTRO, R. M. d. et al. Ativadores químicos de resistência: A experiência brasileira com o bion. In: UFL. **Anais da III Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa, 2007. p. 303.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida**. Capítulo do livro: Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba, FEALQ, 2005. 81-124 p.
- COSTA, P. C.; CANIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Produção de pepino de plantas enxertadas cultivadas em soluções nutritivas com diferentes teores de potássio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 207–209, 2001.
- COUTINHO, T. C.; RODRIGUES, R. A. L.; N, O. E. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *penicillium digitatum* com quitosana. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Florianópolis: [s.n.], 2014.
- DERAL. **Olericultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/olericultura_2014_15.pdf, Acessado em 13 de junho 2015.
- DEVLEIGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703–714, 2004.
- DIAS, J. A. C. S.; IAMAUTI, M. T. **DOENÇAS DA BATATEIRA**. Capítulo 14 do livro: Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 137-164 p.
- DOMINGUES, R. J.; TOFOLI, J. G. Doenças fúngicas na produção de mudas de olerícolas. **Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal**, v. 87, 2008.

- DURRANT, W.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 185–209, 2004.
- DUTTA, P. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173–1182, 2009.
- EL-KATATNY, M. H. et al. Characterization of a chitinase and an *endo-beta-1,3-glucanase* from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the *phytopathogen Sclerotium rolfsii*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 137–143, 2001.
- EMATER. **Segurança Alimentar e Nutricional**. www.mds.gov.br/segurancaalimentar, Acessado em 17 de março 2015.
- FELIPINI, R. B.; PIERO, R. M. D. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1591–1597, 2009.
- FERREIRA, M. E.; CASTELLANE, P. D.; CRUZ, M. C. P. **Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba: Potafos, 1993. 487 p.
- FILHO, F. R. F.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.
- FONTES, P. C. R. **Olericultura: Teoria e Prática**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005.
- FRANCO, F.; IRITI, M. Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. **Caryologia**, v. 60, n. 1-2, p. 121–124, 2007.
- FREDDO, A. R. et al. Efeito da quitosana na emergência, desenvolvimento inicial e caracterização bioquímica de plântulas de *Acacia mearnsii*. **Revista Árvore**, v. 36, p. 1039–1046, 2012.
- FREDDO, A. R. et al. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1–4, 2014.
- GHAOUTH, A. E. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v. 82, n. 4, p. 398–402, 1992.
- GHAOUTH, A. E. et al. Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology**, v. 84, n. 3, p. 313–320, 1994.
- GHAOUTH, A. E. et al. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, n. 2, p. 183–194, 1997.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- GUZZO, S. D. et al. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e *beta-1,3-glucanases* por *acibenzolar-S-metil*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 376–381, 2004.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.-P.; LOON, L. van. Inducing resistance: A summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Kluwer Academic Publishers, v. 107, n. 1, p. 1–6, 2001.

HEIL, M. et al. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: Does systemic acquired resistance (sar) incur allocation costs? **Journal of Ecology**, v. 88, n. 4, p. 645–654, 2000.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. et al. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 541–547, 2008.

IBGE. **Estatística da Produção Agrícola**. www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/indicadores.php, Acessado em 30 de novembro 2014.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 5, p. 485–492, 2003.

KHOR, E. **Chitin: Fulfilling a biomaterials promise**. Oxford: Elsevier Science, 2001.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339 – 2349, 2003. Focus on Biomaterials Science in Asia.

KRUGNER, T. L. **Doenças do eucalipto - *Eucalyptus spp.*** Capítulo do livro: Manual de fitopatologia, São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 275-296 p.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 7–12, 2001.

KÜHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: Aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 140 p. Tese (Doutorado) — Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: Atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2002.

LANDI, L.; FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 14, p. 3047–3056, 2014. PMID: 24627944.

LEE, S. et al. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, v. 121, n. 1, p. 147–152, 1999.

LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 300–306, 2007.

- LOON, L. C. V.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453–483, 1998.
- LOPES, J. F.; CARVALHO, S. I. C.; PESSOA, H. B. S. V. **Recursos genéticos de melão e pepino na Embrapa Hortaliças**. Capítulo do livro: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1999.
- LUZ, J. M. Q.; SHINZATO, A. V.; SILVA, M. A. D. da. Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 7–15, 2007.
- MAIA, A. J. et al. Efeitos da quitosana no desenvolvimento *in vitro* de videiras cv. merlot e no crescimento micelial do fungo *Elsinoe ampelina*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1425–1430, 2010.
- MAZARO, S. M. 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.
- MEDEIROS, F. H. V. et al. Transcriptional profiling in cotton associated with bacillus subtilis induced biotic-stress tolerance. **Plant and Soil**, v. 347, n. 1-2, p. 327–337, 2011.
- MELO, P. C. T. de. Cultivares de tomate com características agronômicas e industriais para a produção de atomatados. In: ABH. **Anais do Congresso Brasileiro de Olericultura**. Salvador, 2012. v. 30, p. 8446–8454.
- MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F. **Fungos relatados em plantas no Brasil**. <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/micbanco01a.asp>, Acessado em 13 de junho 2015.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais**. Capítulo do livro: Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Cap. 1. Recife: UFRPE, 2005. 1-18 p.
- MORETTI, C. L. Boas práticas agrícolas para a produção de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, 2003.
- NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. 1. ed. Wageningen: Editora Prota, 2006. 104 p.
- NEGREIROS, R. J. Z. et al. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas prata com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 51–58, 2013.
- NUEZ, F. **El cultivo del tomate**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2001. 793 p.
- OH, S. K.; CHO, D.; YU, S. H. Development of integrated pest management techniques using biomass for organic farming. **Korean Society of Plant Pathology**, v. 14, n. 1, p. 278–285, 1998.
- ORSOMANDO, G. et al. Pcf protein from *Phytophthora cactorum* and its recombinant homologue elicit *phenylalanine ammonia lyase* activation in tomato. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 7, p. 1470–1476, 2003.

- PASTUCHA, A. Chitosan as a compound inhibiting the occurrence of soybean diseases. **Hortorum Cultus**, v. 7, n. 3, p. 41–55, 2008.
- PEREIRA, R. et al. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e *acibenzolar-S-metil*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 171–178, 2018.
- PIERO, R. M. D.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1121–1128, 2008.
- PIERO, R. M. D. et al. Polissacarídeos na ativação de mecanismos de defesa latentes das plantas. **VII Reunião Brasileira de Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**, Maringá, 2014.
- RAY, J. Lês maladies cryptogamiques des végétaux. **Review Genetic Botanic**, Review Genetic Botanic, v. 13, n. 1, p. 145–151, 1901.
- REDDY, M. V. B. et al. Effect of chitosan on growth and toxin production by *alternaria alternata f. sp. lycopersici*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 33–43, 1998.
- RESENDE, M. L. V. et al. Novos indutores de resistência contra doenças em cafeeiro, cacaueteiro, algodoeiro e tomateiro: Perspectiva de utilização. In: UFL. **Anais da III Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa, 2007. p. 161–182.
- ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTERS, D. S. **Cucurbits**. Cambridge: CAB International, 1999. 226 p.
- 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, n. 5, p. 492–499, 2006.
- ROMANAZZI, G.; GABLER, F. M.; SMILANICK, J. Preharvest chitosan and postharvest uv irradiation treatments suppress gray mold of table grapes. **Plant Disease**, Am Phytopath Society, v. 90, n. 4, p. 445–450, 2006.
- ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1862–1867, 2002.
- SATHIYABAMA, M.; BALASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in arachis hypogaea against leaf rust caused by puccinia arachidis sp. **Crop Protection**, v. 17, n. 4, p. 307–313, 1998.
- SIGNINI, R. **Estudo das relações estrutura/propriedades de quitina e quitosana**. 167 p. Tese (Doutorado) — Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2002.
- SILVA, F. d. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. d. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL ENGINEERS. **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**. Reno, 2009.
- SILVA, R. A. da et al. **Defesa contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica, 2008. 56 p.

- SIMMONS, C. R. The physiology and molecular biology of plant *1,3-beta-D-glucanases* and *1,3;1,4-beta-D-glucanases*. **Crit Rev Plant Science**, v. 13, n. 1, p. 325–387, 1994.
- SMITH, C. Tansley review no. 86 accumulation of *phytoalexins*: Defence mechanism and stimulus response system. **New Phytologist**, v. 132, n. 1, p. 1–45, 1996.
- STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 175–177, 2000.
- STAMFORD, T. C. M.; M, S. T. L.; O, F. L. **Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente**. Capítulo do livro: Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 1. ed. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568 p.
- STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 11, n. 1, p. 16–21, 1998.
- STEPHENS, C. T.; POWELL, C. C.; SCHMITTHENNER, A. F. A method of evaluating post-emergence damping-off pathogens of breeding plants. **Phytopatology**, Lancaster, v. 71, n. 1, p. 1125–1128, 1981.
- STICHER, L. et al. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 235–270, 1997.
- TAN, S. C. et al. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, n. 4, p. 239–242, 1996.
- TANADA-PALMU, P. S. et al. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 2, p. 291–297, 2005.
- TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: A brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 1, p. 1–13, 2004.
- URBEN, A. F. **Curso sobre taxonomia de *Fusarium spp.*** Brasília, 2009.
- WARD, E. R. et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic adquerid resistance. **Plant Cell**, v. 3, n. 1, p. 1085–1094, 1991.
- WESSELS, J.; SIETSMA, J. Fungal cell walls: A survey. In: TANNER, W.; LOEWUS, F. (Ed.). **Plant Carbohydrates II**. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 1981, (Encyclopedia of Plant Physiology, v. 13 / B). p. 352–394.
- WIRTH, S.; WOLF, G. Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3-beta-glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 511–519, 1992.
- ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, n. 1, p. 195–202, 1997.
- ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **Journal of Horticultural Science Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 763–767, 1998.

ANEXO A – REGISTROS DOS EXPERIMENTOS



Figura 14: Sementes olerícolas
Fonte: Autoria própria.

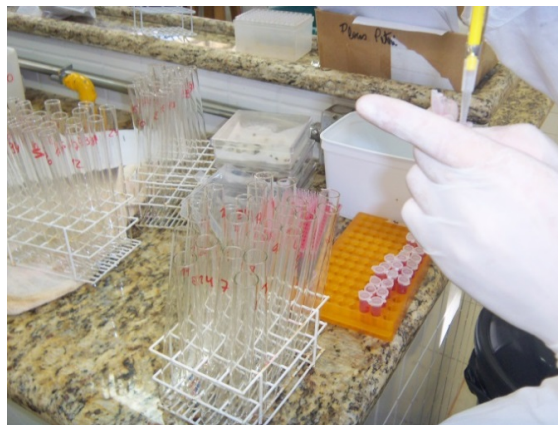


Figura 15: Análises bioquímicas
Fonte: Autoria própria.



Figura 16: Análises bioquímicas
Fonte: Autoria própria.

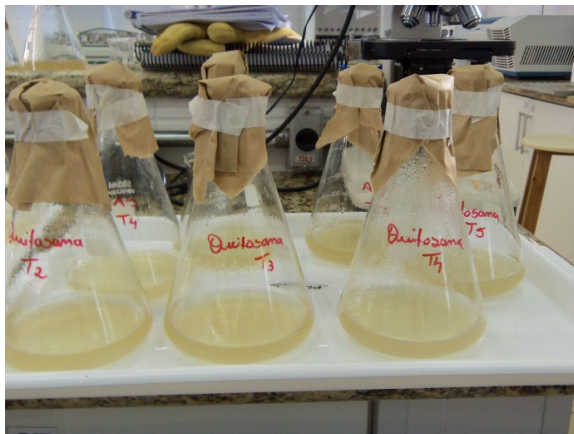


Figura 17: Preparação de quitosana
Fonte: Autoria própria.



Figura 18: Inoculação dos fungos com meio B.D.A. com quitosana
Fonte: Autoria própria.



Figura 19: Inoculação dos fungos no meio B.D.A.
Fonte: Autoria própria.

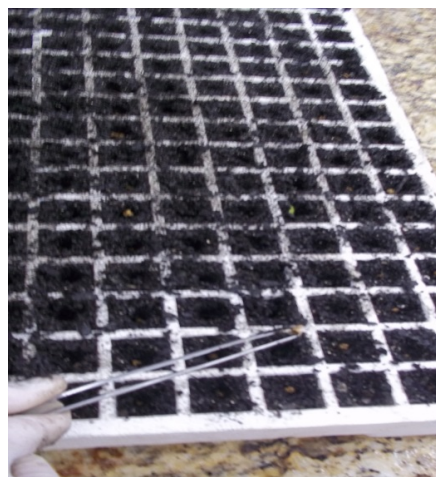


Figura 20: Experimento em bandejas de poliestireno
Fonte: Autoria própria.



Figura 21: Experimento em bandejas de poliestireno
Fonte: Autoria própria.