

**SÉRGIO MIGUEL MAZARO**

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS EM MORANGUEIRO PELO  
USO DE ELICITORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**Orientador:**

Prof. Dr. Cícero Deschamps

**Co-orientadores:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Louise Larissa May De Mio

Prof. Dr. Luiz Antônio Biasi

**CURITIBA**

**2007**

**DEDICO:**

A Deus pelo conforto espiritual nos momentos de ansiedade e incertezas;

A minha filha Gabriela e à esposa Mariângela pela compreensão nos momentos de ausência;

A minha mãe Severina (*in memoria*) pela sua força de viver, acreditar e transmitir amor, a qual partiu durante a fase em que escrevia este trabalho;

A meu pai Santo pelo seu poder de superação, bondade e 20 anos de sobriedade;

A minhas irmãs Sueli, Sirlei e Sirlene pelo constante apoio em minhas ações.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade;

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo apoio;

À Universidade Federal de Santa Maria pelo auxílio;

À Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – Piracicaba pelo auxílio;

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal – Curitiba - PR;

Ao professor Dr. Cícero Deschamps pela orientação, apoio, confiança e amizade;

Aos professores co-orientadores Dra. Louise Larissa May De Mio e Dr. Luiz Antônio Biasi pelo incentivo e contribuição para minha formação acadêmica e profissional;

Aos colegas Alfredo de Gouvêa, Celso Ramos, Hernan Vielmo, Almir Gnoatto e Genuíno Negri pela caminhada conjunta;

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita da UFSM, pelo auxílio e condução das análises experimentais;

Aos amigos e colegas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo estímulo;

À professora Dra. Marisa Cácia de Oliveira pelo auxílio nas análises bioquímicas;

Aos bolsistas e estagiários Silvério Hennig, Jorge Paulo Ferreira e Fernando Gafuri pela grande dedicação nos experimentos;

À empresa Bioagro pela doação das mudas de morangueiro;

À empresa Beltrame Plásticos Ltda, pela doação dos materiais de consumo utilizados nos experimentos em campo.

O conhecimento pronto estanca o saber e a dúvida  
provoca a inteligência (Vigotsky, 1987).

## BIOGRAFIA DO AUTOR

SÉRGIO MIGUEL MAZARO, filho de Santo Natal Mazaro e Severina Rampasso Mazaro, nasceu em Nonoai – RS, em 10 de janeiro de 1971. É casado com Mariângela Bertoldo Langone, e pai da Gabriela Langone Mazaro.

Cursou nos anos de 1986 a 1988 o Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Sertão – RS; de 1991 a 1996 estudou Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria e de 1996 a 1998 dedicou-se ao mestrado em Agronomia – Produção Vegetal, na mesma Instituição.

Atua na docência desde 1998, sendo professor da Escola Agrotécnica Federal de Rio do Sul – UNED, Dois Vizinhos, até 2004. Posteriormente, em 2005, ingressou no Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná. Atualmente atua na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, onde ministra as disciplinas de Fruticultura e Fitopatologia. Em fevereiro de 2005 iniciou o Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO .....	4
2.2. DOENÇAS DO MORANGUEIRO .....	4
2.2.1. Mancha-de-micosferela .....	5
2.2.2. Mancha-de-dendrofoma .....	6
2.2.3. Flor-preta .....	7
2.2.4. Mofo-cinzento .....	8
2.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA .....	9
2.3.1. Resistência Sistêmica Adquirida .....	10
2.3.2. Mecanismos envolvidos na Resistência Sistêmica Adquirida .....	15
2.4. QUITOSANA NA DEFESA VEGETAL .....	19
2.5. ACIBENZOLAR-S-METIL NA DEFESA VEGETAL .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25

<b>3. CAPÍTULO II – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS FOLIARES E DE FLORES EM MORANGUEIRO POR QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METIL</b> .....	40
RESUMO .....	40
ABSTRACT.....	40
3.1. INTRODUÇÃO .....	41
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
3.2.1. Experimento 1.....	43
3.2.1.1. Experimento em campo .....	43
3.2.1.2. Avaliação das doenças .....	44
3.2.1.3. Análises bioquímicas .....	44
3.2.2. Experimento 2.....	46
3.2.3. Demonstrativo cronológico dos experimentos .....	48
3.2.4. Análise estatística dos experimentos.....	48
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
3.4. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS .....	59
<b>4. CAPÍTULO III - COMPORTAMENTO PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE MORANGUEIRO APÓS A APLICAÇÃO DE QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METIL DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA CULTURA.</b> .....	64
RESUMO .....	64
ABSTRACT.....	65

4.1.	INTRODUÇÃO .....	66
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	67
4.2.1.	Experimento em campo .....	67
4.2.2.	Análises físico-químicas e avaliações de doenças .....	68
4.2.3.	Análises fisiológicas, bioquímicas e sensoriais .....	69
4.2.4.	Demonstrativo cronológico do experimento .....	70
4.2.5.	Análises estatísticas .....	71
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
4.4.	CONCLUSÕES .....	80
	REFERÊNCIAS .....	81
5.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	86



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1 Massa média dos frutos (g), produtividade ( $\text{g.planta}^{-1}$ ) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para incidência e severidade de mancha-de-micosferela e incidência de mancha-de-dendrofoma de plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004. ....49
- Tabela 3.2. Incidência de flor-preta nas estruturas da planta (pecíolo foliar, no fruto e na flor) em plantas de morangueiro da cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004..... 54
- Tabela 3.3. Concentração de proteínas ( $\text{mg.g tecido}^{-1}$ ) aminoácidos ( $\text{mg.g tecido}^{-1}$ ), açúcares totais e redutores ( $\text{mg.g tecido}^{-1}$ ) e fenóis totais ( $\text{mg.g tecido}^{-1}$ ) presentes nos extratos foliares de plantas de morangueiro da cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004. ....56
- Tabela 3.4 Atividade de peroxidases (unidade enzimática.minuto<sup>-1</sup>), quitinases ( $\text{UAbs.min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ ) e  $\beta$ -1,3 Glucanases ( $\text{UAbs.min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ ) presentes nos extratos foliares de plantas de morangueiro da cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2005.....58
- Tabela 4.1. Comportamento da firmeza de polpa ( $\text{N/cm}^2$ ) e acidez titulável ( $\text{meq.100mL}^{-1}$ ) de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004 .....73

- Tabela 4.2. Comportamento de sólidos solúveis totais (°Brix) e perda de massa (%) de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004 .....74
- Tabela 4.3 Podridões em pós-colheita de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004.....75
- Tabela. 4.4. Respiração, produção de etileno, conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e açúcares redutores de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004.....79

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 3.1. Curva de progresso da incidência de mancha-de-micosferela em plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR,2004. ....51
- Figura 3.2. Curva de progresso da severidade de mancha-de-micosferela em plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004. ....51
- Figura 3.3. Curva de progresso da incidência de mancha-de-dendrofoma em plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004. ....52
- Figura 3.4. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para incidência (A) e severidade (B) de mancha-de-micosferela em plantas de morangueiro cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR. ....53
- Figura 3.5. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para incidência de mancha-de-dendrofoma em plantas de morangueiro cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004.....54

- Figura 4.1. Incidência de podridões pós-colheita de frutos de morango cultivar Aromas, sem a inoculação, em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004... 77
- Figura 4.2. Incidência de podridões pós-colheita de frutos de morango cultivar Aromas, com inoculação em campo e em pós-colheita com *Botrytis cinerea*, em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004... 77
- Figura 4.3. Respiração de frutos de morango cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004... 79
- Figura 4.4. Produção de etileno de frutos de morango cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004... 80

**LISTA DE QUADROS**

- Quadro 3.1. Demonstrativo cronológico do plantio das mudas, início da aplicação dos tratamentos, coleta de tecidos foliares para análises bioquímicas e momentos das avaliações de doenças, para os experimentos 1 (ano 2004) e 2 (ano 2005). UTFPR, Dois Vizinhos, 2004/2005.....48
- Quadro 4.1. Demonstrativo cronológico do plantio das mudas, início da aplicação dos tratamentos e os momentos das avaliações pós-colheita dos frutos. UTFPR, Dois Vizinhos, 2004. ....70

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença

AJ – Ácido Jasmônico

AS – Ácido Salicílico

ASM – acibenzolara-S-metil

EAOs – Espécies Ativas de Oxigênio

ET – Etileno

PAL- fenilalanina amônia-liase

Proteínas-RPs – Proteínas relacionadas à patogenicidade

RH – Resposta de Hipersensibilidade

RLA – Resistência Local Adquirida

RSA- Resistência Sistêmica Adquirida

RSI – Resistência Sistêmica Induzida

SOD - Superóxido dismutase

SST – Sólidos Solúveis Totais

## RESUMO

A demanda mundial por alimentos isentos de agrotóxicos tem impulsionado a pesquisa para a busca de métodos alternativos ao controle de patógenos em plantas. A ativação dos mecanismos de defesa com o uso de indutores vem demonstrando ser uma alternativa viável e promissora. Assim sendo, foram desenvolvidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos – PR, nos anos de 2004 e 2005, trabalhos com o objetivo de avaliar o efeito dos indutores de resistência quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) sobre o desenvolvimento das doenças do morangueiro mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*), flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) e mofo-cinza (*Botrytis cinerea*), relacionando-as com a ação bioquímica e a resposta de defesa vegetal, durante o desenvolvimento da cultura e em pós-colheita dos frutos. O delineamento do experimento a campo foi de blocos ao acaso com quatro repetições contendo 16 plantas por parcela. Para a avaliação pós-colheita foram utilizados 25 frutos por unidade experimental, coletados aleatoriamente nas plantas de cada parcela. Foram avaliados os elicitores quitosana (0,5; 1,0 e 2,0%) e ASM (0,00025%). O tratamento controle seguiu um cronograma de aplicação de fungicidas convencionais, sendo utilizado tiofanato-metílico (0,0049%); iprodione (0,0075%) e folpete (0,00135%). À testemunha aplicou-se água destilada, sendo a frequência de aplicações dos produtos a cada sete dias, totalizando 20 aplicações. O uso dos indutores não interferiu na produtividade e na massa média dos frutos. Quitosana e ASM atuaram sobre a redução da mancha-de-micosferela, mancha-de-dendrofoma e flor-preta em morangueiro. O uso dos indutores interferiu nos parâmetros bioquímicos foliares de aminoácidos, açúcares totais, açúcares redutores e fenóis totais mantendo os valores das médias das avaliações superiores à testemunha. A atividade das peroxidases,  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases foram aumentadas pelo uso dos indutores, sendo as  $\beta$ -1,3-glucanases pronunciadas nas primeiras 120 horas após a aplicação dos indutores e as quitinases a partir de 168 horas da indução. Os resultados obtidos em pós-colheita demonstraram que o tratamento das plantas com quitosana, nas três concentrações avaliadas, retardou a maturação dos frutos, mantendo maior firmeza de polpa e acidez titulável, além de diminuir a perda de massa. Estes tratamentos também diminuíram a produção de etileno, o teor de açúcares redutores e mantiveram mais elevados os teores de polifenóis totais. Quitosana, nas três concentrações avaliadas, induziu maior resistência das plantas aos patógenos, resultando na diminuição das podridões de frutos em pós-colheita

causadas por *B. cinerea*. No entanto, a concentração de 2% de quitosana causou dano aos frutos na pós-colheita elevando a taxa respiratória e o teor de açúcares redutores. O ASM teve efeito na retenção da acidez titulável e na redução de podridões, similar ao tratamento com fungicidas. A aplicação de quitosana e ASM na pré-colheita não interferiu na qualidade organoléptica dos frutos em pós-colheita.

**Palavras-chave:** *Fragaria x ananassa*, resistência sistêmica adquirida, Proteínas-RPs.



## ABSTRACT

The worldwide demand for foods without pesticides has stimulated the research on alternative methods to control pathogens in plants. The activation of defense mechanisms by inductors seems a viable and promising alternative. This work was carried out in 2004 and 2005 at Federal Technological University of Parana State located in Dois Vizinhos - PR, with the objective to evaluate the induction of resistance by chitosan and Acibenzolar-S-Methyl (ASM) in disease development of strawberry plants against mycosphaerella blight (*Mycosphaerella fragariae*), dendrophoma blight (*Dendrophoma obscurans*), black flower rot (*Colletotrichum acutatum*), and grey mould (*Botrytis cinerea*), relating to the biochemist action and the plant defense response during the fruit development and the fruits postharvest. The experimental design used was a randomized block with four replications containing 16 plants each. The postharvest evaluation was done by using 25 fruits collected randomly from the plants of each parcel. The effect of the elicitor chitosan (0.5; 1.0 and 2.0%) and ASM (0.0025%) was evaluated in relation to control plants (distilled water only) and those with fungicides application tiofanato-metilico (0.0049%); iprodione (0.0075%) and folpete (0.00135%). The frequency of applications of the products was at each seven days, totalizing 20 applications. The use of inductors did not decrease the productivity or fruit average fresh weight. Chitosan treatment and ASM had acted on the reduction of mycosphaerella blight (*M. fragariae*), dendrophoma blight (*D. obscurans*) and black flower rot (*C. acutatum*) in strawberry plants. Plant treatment with inductors also resulted on leaf biochemical parameters changes where amino acids, total sugar, reducing sugars and total phenol concentrations were higher than in control plants. The use of inductors activated peroxidases,  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases being the activity of  $\beta$ -1,3-glucanases great during the first 120 hours and chitinases after 168 hours of inductors application. The treatment of the plants with chitosan, in all three evaluated concentrations, delayed the fruit maturation, increased the flesh firmness and titratable acidity and decreased the mass loss. It was also observed ethylene production and the reducing sugars reduction and total poliphenol increase in strawberry fruits. The chitosan treatment in all three evaluated concentrations induced greater plant resistance to diseases with effect on the reduction of the fruit rots in the postharvest by *Botrytis cinerea*. Although, chitosan treatment in the concentration of 2% caused damage to the fruits in the postharvest, it increased the respiration rate and the sugar reduction. The ASM had effect on the retention of the titratable acidity and acted efficiently to rot reduction similar to the treatment with fungicides. The

application of chitosan and ASM did not intervene in the organoleptic quality of the fruits in the postharvest.

**Key-words:** *Fragaria x ananassa*, systemic acquired resistance, PRs-proteins.

## 1- INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é produzido e apreciado nas mais variadas regiões do mundo, sendo a espécie de maior expressão econômica do grupo das pequenas frutas, com uma produção mundial de 3,1 milhões de toneladas (OLIVEIRA et al., 2006). No Brasil a cultura teve grande expansão a partir da década de 60, com difusão em regiões de clima temperado e sub-tropical, destacando-se pela alta rentabilidade por área e demanda intensa de mão-de-obra (SANTOS, 2003). A produção brasileira fica em torno de 105.000 toneladas anuais, em uma área estimada de 3.500 ha (ANTUNES, 2006), com destaque para Minas Gerais (41,4%) Rio Grande do Sul (25,6%) São Paulo (15,4%) e Paraná (4,7%) (RIGON et al., 2005). No Paraná, grande parte da produção concentra-se nas regiões Norte e metropolitana de Curitiba. A produção de morangos na região Sudoeste do Paraná, apesar da pequena expressão no cenário estadual, vem se expandindo, com destaque para o cultivo orgânico.

Mesmo com o melhoramento genético das cultivares, nos últimos anos, na busca de qualidade, produtividade e resistência, estas apresentam alta suscetibilidade a diversas doenças, sendo considerado um dos principais fatores limitantes ao cultivo do morangueiro (PAULUS, 1990; TANAKA, 2002). Na literatura, são citadas 51 espécies de fungos, três de bactérias, oito de nematóides e 26 de vírus afetando a cultura (MAAS, 1998). Entre as principais doenças observadas no Sudoeste do Paraná, causadas por fungos, destaca-se a mancha-de-micosferela, mancha-de-dendrofoma, flor-preta e o mofo-cinzento nos frutos. A mancha-de-micosferela é a principal doença foliar e é causada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau que pode causar perdas da ordem de 10 a 100% (TANAKA et al., 2005). A mancha-de-dendrophoma causada pelo fungo *Dendrophoma obscurans* (Ell. & Ev.) H.W. Anderson é observada na fase inicial (10 a 30 dias) e no final do ciclo da cultura, infectando as folhas mais velhas. A doença denominada flor-preta causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds é, atualmente, a principal doença da cultura e pode causar perda total da lavoura. O principal patógeno associado aos frutos, em condições de campo e pós-colheita, é o fungo *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr., que causa a doença conhecida como mofo-cinzento, cuja característica é a formação sobre os frutos de uma massa de micélio de cor cinza, de onde vem o nome da doença (COSTA & VENTURA, 2006).

O clima no Brasil é extremamente favorável ao desenvolvimento da maioria dos patógenos, que aliado ao cultivo intensivo, ausência de cultivares resistentes e práticas culturais inadequadas torna inevitável o controle químico, sendo realizadas de 30 a 40

aplicações somente de fungicidas, durante o ciclo do morangueiro (COSTA et al., 2003). Além da alta carga de agrotóxicos na cultura, a utilização dos fungicidas para doenças como a flor-preta tem apresentado baixa eficiência, além da ocorrência de resistência ao grupo químico dos benzimidazóis (COSTA & VENTURA, 2006). Análises realizadas em morango no Estado do Paraná, no ano de 2003, demonstraram uma situação preocupante, uma vez que, 92,3% dos morangos possuíam algum grau de contaminação com agrotóxicos. Destas amostras 79,2% apresentaram resíduos de agrotóxicos em desacordo com a legislação vigente, com a presença de produtos não autorizados para a cultura do morango ou com resíduos acima do permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (SESA, 2003).

A produção de alimentos mais saudáveis, isentos de resíduos tóxicos, vem sendo enfatizada nos últimos anos, e com isso, vários trabalhos são realizados com métodos de controle alternativos de fitopatógenos (JANISIEWICZ, 1996; FRANCO & BETTIOL, 2000; CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003). A indução de resistência em plantas à patógenos com a utilização de elicitores é relatada em diferentes culturas (LOPEZ, 1991; PICCINI, 1995; SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998; HEIL & BOSTOCK, 2002; TERRY & JOYCE, 2004).

A utilização da quitosana na agricultura está ganhando importância pela sua ação como indutor de resistência em planta à diversas espécies de fitopatógenos. A ação da quitosana está relacionada ao aumento de ácido salicílico (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998), indução à produção de metabólitos secundários (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006) e a ativação de enzimas relacionadas à patogenicidade (ZHANG & QUANTICK, 1997; ZHANG & QUANTICK, 1998; ROMANAZZI et al., 2002). O efeito benéfico de quitosana na cultura do morangueiro já foi observado para o controle de *Phytophthora fragariae* e *P. cactorum* (EIKEMO et al., 2003); *Botrytis cinerea* (EL GHAOUTH et al., 1992; REDDY et al., 2000) e *Rhizopus stolonifer* (EL GHAOUTH et al., 1992).

O acibenzolar-S-methyl (ASM) é um indutor químico sintético, derivado do benzotriazol, e tem sido amplamente citado como agente ativador dos mecanismos de defesa de plantas, com ação na resistência sistêmica adquirida (STICHER et al., 1997), de forma análoga ao ácido salicílico (VALLAD & GOODMAN, 2004). Ativa as proteínas relacionadas a patogenicidade (KATZ et al., 1998) e tem demonstrado efeito indutor em várias culturas, sobre diferentes patógenos, como em morangueiro no controle de *B. cinerea* (TERRY & JOYCE, 2000). No Estado do Paraná o ASM (Bion<sup>®</sup>) possui registro para a cultura do tomateiro no controle de *Alternaria solani* e *Xanthomonas campestris* (SEAB, 2007).

No Brasil, na cultura do morangueiro, estes elicitores ainda não foram utilizados para indução da resistência. Assim sendo, este trabalho teve por objetivos:

- 1- Avaliar o efeito de quitosana e ASM sobre o desenvolvimento das doenças mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*), flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) e mofo-cinzento (*Botrytis cinerea*) em morangueiro;
- 2- Verificar, por meio de análises bioquímicas foliares, a indução de compostos ativados pelo uso de quitosana e ASM e relacionados à patogênese;
- 3- Detectar a resposta de quitosana e ASM, na pós-colheita dos frutos, por meio de análises físico-químicas, bioquímicas e fisiológicas.

## 2- CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO

O morangueiro pertence à família Rosaceae, ao gênero *Fragaria* com cerca de 18 espécies e quatro híbridos. O híbrido *Fragaria x ananassa* Duch. Ex Rozier, resultante da hibridação natural entre as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana*, é o mais cultivado atualmente (SILVA et al., 2007). A grande variabilidade entre as espécies que compõem a base genética de *Fragaria x ananassa* permite uma maior amplitude de adaptação e qualidade das cultivares comerciais de morangueiro (OLIVEIRA & SANTOS, 2003).

O morangueiro é originário da América do Norte e do Chile, sendo os EUA o maior produtor mundial, seguido pela Espanha, Rússia, Coreia do Sul, Japão, Polônia, Itália, Turquia e México (DUARTE FILHO et al., 2007). No Brasil, os primeiros registros do cultivo do morangueiro são do final do século XVIII em jardins e hortas caseiras. A partir de meados do século XIX, a cultura passou a ganhar importância econômica no Rio Grande do Sul, mas foi em São Paulo, nos anos 60, que ocorreu um grande incremento na produção nacional (DIAS et al., 2007). O Estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, seguido por São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo, Distrito Federal, Santa Catarina e Goiás (REICHERT & MADAIL, 2003).

Os principais materiais genéticos plantados no Brasil até a década de 80 eram exclusivamente nacionais, destacando-se as cultivares Campinas, Monte Alegre, Konvoy, Cascata e BR1 (REICHERT & MADAIL, 2003). Entretanto, nos últimos anos essas foram sendo substituídas por cultivares que provêm dos Estados Unidos (cultivares Aromas, Camarosa, Dover, Oso Grande e Sweet Charlie), da Espanha (cultivar Milsei-Tudla) de programas de melhoramento genético da Embrapa de Clima Temperado (cultivares Bürkley, Santa Clara e Vila Nova); e do Instituto Agrônomo de Campinas (cultivar Campinas) (BRAHM et al., 2005). Essas novas cultivares apresentam frutos maiores, polpa mais firme, melhor sabor, maior produtividade e maior resistência fitossanitária (REICHERT & MADAIL, 2003).

### 2.2. DOENÇAS DO MORANGUEIRO

A grande maioria das doenças que afetam o morangueiro são provocadas por fungos, sendo a ocorrência da antracnose-do-rizoma (*Colletotrichum fragariae* Brooks), do fruto (*Colletotrichum spp.*) e da flor-preta (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) as doenças

de destaque devido à redução do potencial produtivo das cultivares de maior importância comercial (TANAKA, 2002). Considera-se também de grande importância a ocorrência da mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-diplocarpo (*Diplocarpon esrliana*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*), murcha de verticillium (*Verticillium albo-atrum*) podridão da coroa, frutos e dos brotos (*Rhizoctonia solani*), oídio (*Sphaerotheca macularis*), podridão de esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*), podridão de phytophthora (*Phytophthora cactorum*), além de doenças causadas por bactérias, como a mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) e doenças viróticas, como clorose marginal (SMYEV), encrespamento (SCV), mosqueado (SMoV), faixa das nervuras (SVBV) e ilarvirus em morangueiro (TANAKA et al., 2005). Outras são mais importante no período pós-colheita, depreciando o produto comercializado, como o mofo-cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.), podridão-de-rizopus (*Rhizopus stolonifer* Ehrenb.: Fr.) e podridão de penicillium (*Penicillium digitatum*) (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003).

Entre as várias doenças listadas da cultura do morangueiro, as mais observadas e de importância econômica no Sudoeste do Paraná são: mancha-de-micosferela, mancha-de-dendrofoma, flor-preta e mofo-cinzento nos frutos.

### 2.2.1. Mancha-de-micosferela

A mancha-de-micosferela é a doença do morangueiro de ocorrência mais generalizada e pode ser encontrada em todas as regiões de cultivo. É causada por *Mycosphaerella fragariae*, cuja forma assexuada corresponde a *Ramularia tulasnei* Sacc. A doença, inicialmente, manifesta-se como manchas pequenas, de cor púrpura escura de contornos definidos. Com o crescimento das lesões formam-se manchas aproximadamente circulares de 3 a 5 mm de diâmetro, de bordos vermelho-púrpura, com o centro levemente deprimido, necrosado, de cor acinzentada. Sob ataques severos estas manchas podem coalescer e comprometer toda a área dos folíolos (TANAKA et al., 2005). As condições ambientais, a cultivar e a raça do patógeno podem determinar o tamanho e a coloração das lesões foliares, que às vezes podem ser limitadas a pequenas pontuações púrpuras (MAAS, 1998).

Os peritécios da forma perfeita são escuros, globosos, parcialmente imersos, medem de 100-150 µm de diâmetro e são providos de pequenos ostíolos. As ascas são cilíndricas e clavadas, com 30-40 µm x 10-5 µm e contêm ascósporos hialinos e bicelulares, medindo de 12-15 µm x 3-4 µm. *Ramularia tulasnei* forma conídios elípticos a cilíndricos, de 20-40 µm x 3-5 µm, hialinos, podendo conter até quatro septos. Os conídios desempenham

um importante papel na epidemiologia da doença, como fonte de inóculo, sobrevivendo por longos períodos em folhas ou outras partes da planta infectada, embora os ascósporos também possam iniciar a infecção. A disseminação dos conídios ocorre principalmente pelos respingos de água da chuva e irrigação. Os ascósporos são disseminados pelo vento (TANAKA, 2002). Nas folhas mortas pela doença são formados esclerócios, sendo esta a principal forma de sobrevivência do fungo por longos períodos (MAAS, 1998).

A doença ocorre em maior intensidade na fase inicial do transplântio no campo (março a abril) e final da cultura (setembro a outubro), quando as temperaturas são mais elevadas (COSTA et al., 2003). Os fatores de pré-disposição da doença são temperaturas de 22-26 °C, chuvas prolongadas, irrigação por aspersão e alta umidade relativa (COSTA & VENTURA, 2006). CARISSE et al. (2000) avaliaram a influência de condições de temperaturas e períodos de molhamento foliar sobre a infecção de *Mycosphaerella fragariae*, e observaram que o patógeno se desenvolveu bem de 5° a 25 °C, sendo que a temperatura ótima para infecção foi de 25 °C e no mínimo 12 horas de molhamento foliar.

### **2.2.2. Mancha-de-dendrofoma**

A mancha-de-dendrofoma, causada por *Dendrophoma obscurans* (sin. *Phomopsis obscurans*), é uma doença que afeta as folhas mais velhas, no entanto, pode se tornar importante quando ocorre com muita severidade, por destruir a folhagem, enfraquecendo a planta. As manchas são necróticas, chegando a 25 mm de diâmetro e ocorrem em pequeno número por folha. Frequentemente, localizam-se nos ápices das folhas e crescem em direção ao seu centro, ao longo das nervuras, e adquirem formato elíptico ou forma de "V". No início são circulares, de coloração vermelha púrpura; posteriormente, o centro torna-se marrom-escuro e circundado por uma zona marrom-clara. No centro das lesões, podem ser notadas pequenas pontuações negras, que são os picnídios do fungo. Os picnídios são imersos, negros e globosos, no interior dos quais são formados conídios. Os conídios são hialinos, unicelulares e elípticos e, quando liberados, ficam aderidos aos ostíolos, sendo dispersos pelo impacto de gotas de água (TANAKA, 2002). O patógeno sobrevive de um cultivo ao outro em lesões foliares, que constituem a fonte de inóculo primária para a infecção (TANAKA et al., 2005). Os fatores de pré-disposição da doença são temperaturas de 24° a 28 °C, chuvas prolongadas, irrigação por aspersão e alta umidade relativa (COSTA & VENTURA, 2006).



### 2.2.3. Flor-preta

A flor-preta causada por *Colletotrichum acutatum* é uma das doenças mais importantes do morangueiro, podendo ser limitante para a cultura, em virtude da sua natureza devastadora, da susceptibilidade das cultivares mais utilizadas e da baixa eficiência das medidas de controle disponíveis (TANAKA & PASSOS, 2002). O fungo *C. acutatum* foi detectado pela primeira vez como um patógeno do morangueiro na Austrália em 1954, sendo a partir da década de oitenta, citado como doença potencial em vários países (PARIKKA & LEMMETTY, 2004). No Brasil, as primeiras observações foram no Espírito Santo, em 1993, com a introdução de mudas provenientes do Estado de São Paulo, quando se observaram vários surtos em algumas lavouras da Região Serrana (COSTA et al., 2003).

A sintomatologia denominada flor preta, geralmente é observada nas inflorescências, mas o fungo pode infectar os frutos, pecíolos, limbos foliares e meristemas apicais. A infecção das flores pode ocorrer desde o início da formação do botão até o seu completo desenvolvimento. Os estames, os pistilos e as pétalas tornam-se necrosados e adquirem coloração marrom escura. Frequentemente, a infecção tem início nos pedúnculos, formando lesões alongadas e escuras, atingindo em seguida os cálices, as flores e os frutos. Também é comum as lesões se iniciarem no próprio cálice, coalescendo e necrosando extensas áreas de tecido. A inflorescência toda pode apresentar sintomas e, em infecções severas, ficar com aspecto de queima, com botões, flores e frutos jovens necrosados e mumificados (TANAKA, 2002).

A fase sexual do *Colletotrichum acutatum* corresponde a *Glomerela cingulata* (Ston.) Spauld. & Schrenk. Os conídios são formados em acérvulos quase sempre desprovidos de setas, ou com setas esparsas, muitas vezes encoberta pela massa conidial gelatinosa. Apresentam em geral a forma elíptico-fusiforme, com as extremidades ligeiramente afiladas. As dimensões dos conídios são variáveis, com comprimento de 10,0-14,8 µm e largura de 3,1-5,3 µm (TANAKA, 2002).

A principal forma de introdução do patógeno em novas áreas são mudas com infecção latente (LEANDRO et al., 2001) ou com lesões de mancha-irregular-da-folha, cujos sintomas geralmente passam despercebidos. No verão, essas folhas persistem na muda após o transplante, durante dois a três meses. As folhas novas que se formam são infectadas e nelas ocorre a esporulação, iniciando a infecção das flores e dos frutos que surgem no outono. As inflorescências e os brotos doentes e mumificados, que permanecem nas plantas, mantêm o inóculo para novas infecções (TANAKA, 2002).

A principal forma de disseminação do esporo é pela água da chuva ou da irrigação por aspersão (LEANDRO et al., 2001). Também o vento, os insetos e mesmo o homem, disseminam o inóculo. Existe ainda a possibilidade do patógeno sobreviver em várias plantas hospedeiras alternativas (TANAKA et al., 2005). Também são fatores de pré-disposição da doença temperaturas de 19° - 23 °C, chuvas prolongadas, alta umidade relativa e excesso de nitrogênio (COSTA & VENTURA, 2006).

#### **2.2.4. Mofo-cinzentos**

O mofo-cinzentos causado pelo fungo *Botrytis cinerea* é de ocorrência generalizada, sendo comum em todos os locais onde se cultiva o morangueiro. O fungo ocorre no mundo todo e possui registro de ataque em mais de 200 espécies de plantas, atacando flores, folhas e frutos (HELBIG, 2001). *Botrytis cinerea*, estágio conidial do ascomiceto *Botryotinia fuckeliana* (de Bary), sendo os conídios unicelulares, com medidas de 11 µm x 11-15 µm e as colônias apresentam coloração acinzentada em meio de cultura (TANAKA, 2002). O fungo é considerado um parasita facultativo, com atividade saprofítica na matéria orgânica, formando esclerócios e micélio dormente na ausência do hospedeiro (MAAS, 1998).

Frutos em qualquer estágio de desenvolvimento podem ser afetados. Os sintomas surgem como manchas marrom-claras, de tamanho variável, não aquosa, sem linha demarcando o tecido afetado. As manchas evoluem rapidamente, tomando todo o fruto, que apodrece, adquirindo um aspecto seco e firme, com um recobrimento de cinza, constituído pelas estruturas do fungo (TANAKA et al., 2005). O inóculo primário pode ter origem nos restos culturais do morangueiro ou outras plantas, geralmente em forma de estruturas de resistência. Em condições favoráveis os conídios são facilmente disseminados pelo vento e água. Nas lesões dos frutos a produção de inóculos secundários continua durante o cultivo (TANAKA, 2002). Os frutos podem ser infectados desde o início de sua formação, pela infecção das flores, e neles o fungo permanecer dormente até o amadurecimento. Trabalho realizado por BOFF et al. (2003), concluiu que as pétalas podem constituir-se numa fonte efetiva e estável de inóculo de *B. cinerea*, capaz de causar infecção nos frutos. Considerando uma alta probabilidade de permanência de pétalas durante o estágio de expansão e amadurecimento de frutos, a remoção e/ou neutralização dessas pétalas como fonte de inóculo, pode contribuir substancialmente na redução do mofo-cinzentos do morangueiro, mesmo que a percentagem de retenção de pétalas nos frutos até a colheita seja baixa.

Os fatores de pré-disposição da doença são temperaturas em torno de 20 °C e alta umidade, coincidentes com o inverno e início da primavera (TANAKA et al., 2005).

### 2.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A proteção natural das plantas está baseada em uma série de barreiras pré-formadas e pós-formadas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Os fatores de resistência pré-formados são aqueles presentes na planta antes do contato com o patógeno. Já os pós-formados, estão ausentes ou em baixo nível antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

Estas defesas também podem ser ativadas pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética. Essas moléculas capazes de ativar respostas de defesas nas plantas, são chamadas de elicitores, atuando como indutores de resistência (STICHER et al., 1997). Os elicitores podem induzir a resistência local adquirida (RLA), a resistência sistêmica induzida (RSI) ou a resistência sistêmica adquirida (RSA)(TERRY & JOYCE, 2004).

Há mais de 100 anos tem-se conhecimento que as plantas podem pré-condicionarem defesas contra pragas e doenças (VALLAD & GOODMAN, 2004). O primeiro relato de indução de resistência foi descrito por Ray & Beauverie em 1901, os quais obtiveram indução de resistência em begônia pelo uso de esporos atenuados de *Botrytis cinerea* e relacionaram a indução com as condições ambientais de cultivo. Quase trinta anos mais tarde, Carbonne & Kalaljev confirmaram esse estudo e mostraram que a resistência sistêmica adquirida depende da condição do hospedeiro. Em 1933, Chester observou que plantas susceptíveis podiam adquirir resistência após o primeiro contato com o patógeno avirulento ou após inoculação com forma atenuada do agente patogênico (KESSMANN et al., 1994). Em 1940, Müller & Borger inocularam tubérculos de batatas com uma raça avirulenta de *Phytophthora infestans* e 24 horas mais tarde inocularam com uma raça virulenta. Eles observaram que os tubérculos obtiveram proteção caracterizando a resistência sistêmica adquirida (RSA), com uma reação de hipersensibilidade e o acúmulo de fitoalexinas (GOODMAN et al., 1986). Na década de 60, Ross utilizou plantas de fumo submetidas a uma inoculação prévia localizada com o “tobacco mosaic vírus” (TMV - vírus do mosaico do fumo), e obteve resistência sistêmica contra outros patógenos. Na mesma época, Cruikshank & Mandryk, estenderam esse estudo e inocularam *Peronospora tabacini*,

não virulento, no colo de plantas de fumo e obtiveram aumento da resistência a doenças foliares (VALLAD & GOODMAN, 2004). Ainda nessa época, conforme KUC (2000), alguns trabalhos de indução foram ignorados como os elaborados por Kuc et al. (1959), Loebenstein (1963) e Ross (1966). O mesmo autor afirma ainda que a indução de resistência começou a ter maior importância quando sua utilização estendeu-se ao campo para o controle de fungos, vírus e bactérias.

A partir desses trabalhos pioneiros, pesquisas com indução de resistência foram se multiplicando pelo mundo, com as mais diversas culturas (STICHER et al., 1997; TERRY & JOYCE, 2004; BOSTOCK, 2005). No Brasil, os primeiros estudos foram desenvolvidos em 1970, no Instituto Biológico de São Paulo, pela Dra. Walkyria B.C. Moraes, contra *Hemileia vastatrix*, com o uso de *Saccharomyces cerevisiae*, goma xantana, *Bacillus thuringiensis* e uredosporos inativados de *H. vastatrix* (BONALDO et al., 2005).

Os genes de resistência estão associados com o incremento do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (FEYS & PARKER, 2000; JALALI et al., 2006). A RSA está associada ao AS, o qual é o sinalizador para a expressão de certas proteínas relacionadas à patogenicidade (GRÜNER et al., 2003; GLAZEBROOK, 2005). As diferentes formas de resistência foram descobertas recentemente, pois algumas plantas não respondiam bioquimicamente a indutores como a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*. Essas rizobactérias induzem a RSI e apresentam ação sobre a herbivoria. A RSI é independente do ácido salicílico e não está associada com a ativação dos mesmos genes da RSA. Em substituição ao AS, a RSI requer, para a sua ativação, o aumento dos níveis de AJ e etileno (FEYS & PARKER, 2000; BOSTOCK, 2005). No entanto, essas rotas não parecem estar totalmente independentes pois trabalhos citados por HEIL & BOSTOCK (2002) demonstraram que a herbivoria induz a resistência a uma série de patógenos de diversas culturas e, segundo os autores, essa possível resistência cruzada está em função do indutor ser biológico ou químico e do hábito alimentar do herbívoro.

### **2.3.1. Resistência Sistêmica Adquirida**

A RSA 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 microorganismos (DURRANT & DONG, 2004). Em pepino, por exemplo, uma inoculação primária com o fungo *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose, induziu a RSA a uma série de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, sendo que, o tempo necessário para estabilizar a RSA é dependente da planta e do tipo de

organismo indutor. Uma rápida indução da RSA foi observada em pepino, com apenas 7 horas após a inoculação primária com *Pseudomonas syringae*. Em tabaco a RSA foi verificada somente após 2 a 3 semanas da inoculação primária com *Peronospora parasitica* pv *tabaci* (STICHER et al., 1997). Uma vez estabelecida, a RSA pode durar semanas, sendo que o grau de proteção varia em função da concentração do indutor, do inóculo utilizado, do intervalo de tempo entre o tratamento inicial com o indutor e o contato com o patógeno, das condições de temperatura e luminosidade (GUZZO, 2004), do agente utilizado para a inoculação e do tamanho da necrose ocorrida em função da inoculação do patógeno (STICHER et al., 1997). Plantas de pepinos inoculadas repetidamente com *C. lagenarium* avirulento, mostraram-se protegidas contra o mesmo fungo virulento por 10 semanas (PASCHOLATI & LEITE, 1995). A inoculação por um patógeno avirulento, no surgimento da primeira folha e 2 a 3 semanas mais tarde, protegeu as plantas de pepino até o florescimento (Madamanchi & Kuc, 1991, citados por STICHER et al., 1997).

Molecularmente a RSA é caracterizada pelo expressivo incremento de um amplo número de genes relacionados à patogenicidade. No processo de interação dos microorganismos patogênicos com a planta, ocorre o estabelecimento da compatibilidade (susceptibilidade) ou incompatibilidade (resistência) (HEIL & BOSTOCK, 2002). Uma vez ocorrendo uma interação incompatível ocorrerá uma série de respostas envolvendo liberação de sinais moleculares, iniciando pelo reconhecimento ou percepção, transdução do sinal e tradução para a ativação de genes de defesa (BOSTOCK, 2005).

O receptor geralmente é de natureza proteica e encontra-se na membrana plasmática e no interior da célula. Alguns critérios têm sido seguidos para demonstrar que determinada proteína pode funcionar como um receptor a dado eliciador: este é capaz de transmitir um sinal que é reconhecido na membrana ou no citoplasma celular; os sítios de ligação específicos mostram ser saturáveis, reversíveis e de alta afinidade; deve existir uma correlação quantitativa entre a afinidade do eliciador e de compostos análogos em desencadear as respostas biológicas de defesa (CAVALCANTI et al., 2005).

Os receptores mediam a percepção de sinais derivados do patógeno ou elicitador, causando alterações no metabolismo celular, como ativação de proteínas G, aumento no fluxo de íons através da membrana plasmática, atividade de quinases e fosfatases e a produção de mensageiros secundários (LEITE et al., 1997; CAVALCANTI et al., 2005).

As proteínas G interagem com o receptor e aumentam a afinidade por GTP (guanina trifosfato), sendo que quando ocorre a substituição de GDP (guanina difosfato) pelo GTP a proteína torna-se ativa, interagindo com outras proteínas da membrana plasmática, como as

que funcionam como canais de íons, fosfolipases e fosfodiesterases, sendo que esse complexo passa a ter capacidade de difusão do sinal, induzindo a atividade de proteínas intracelulares específicas (CAVALCANTI et al., 2005).

A abertura de um canal iônico na membrana plasmática ocorre pela interação eliciador/receptor estimulando um fluxo de íons através da membrana, alterando o potencial trans-membrânico e ocasionando a alcalinização extracelular pela entrada dos íons  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  e a saída de  $K^+$  e  $Cl^-$ . A entrada de  $Ca^{2+}$  na célula ativa as reações oxidativas que podem agir diretamente na defesa bem como sinalizar outras reações de defesa (DIXON et al., 1994).

A fosforilação de proteínas é um mecanismo chave no sistema de sinalização para a transdução intracelular de sinais. A fosforilação de proteínas citoplasmáticas por quinases leva ao estímulo de uma oxidase de membrana envolvida na geração do íon superóxido, iniciando a chamada explosão oxidativa (produção de espécies ativas de oxigênio, entre elas  $H_2O_2$ ), indução direta da transcrição gênica, biossíntese de ácido jasmônico e ou etileno e apoptoses (LEITE et al., 1997).

Ácido salicílico, jasmonatos, etileno, óxido nítrico, quinases de proteínas e fosfatases têm sido relatados como elementos envolvidos na transdução de sinais eliciadores, convertendo sinais recebidos em respostas específicas dentro das células. Entre os mensageiros secundários identificados como possíveis mediadores das respostas de defesa destacam-se o cAMP,  $Ca^{2+}$ , complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulinas, quinases de proteínas inositol trifosfato ( $IF_3$ ) e espécies ativas de oxigênio (EAOs) (CAVALCANTI et al., 2005).

A produção de EAOs é requerida para resposta de hipersensibilidade, ou seja, morte programada de células adjacentes à infecção, limitando o acesso do patógeno à água e nutrientes.

As EAOs mais importantes biologicamente são os radicais livres  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^-$  e  $^1O_2$ , sendo consideradas "ativas" porque não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas. O superóxido ( $O_2^-$ ) pode ser produzido na planta por vários mecanismos, inclusive pela ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases da parede celular, lipoxigenases e como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto. O  $O_2^-$  geralmente oxida moléculas orgânicas como o ascorbato ou metais como  $Fe^{3+}$ . Radicais hidroxila ( $OH^-$ ) são extremamente tóxicos, gerados pela conversão de  $H_2O_2$ , na presença de  $Fe^{2+}$ , agem em proteínas reduzindo atividade de enzimas, com lipídios aumentando a permeabilidade de membranas e com o DNA causando mutações. O  $^1O_2$  é predominantemente gerado nos cloroplastos, através da transferência

de energia de uma clorofila foto-excitada para o elétron do oxigênio molecular. O  $^1\text{O}_2$  reage facilmente com ligações duplas e tem afinidade com aminoácidos como histidina, metionina, triptofano e cisteína. O acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode depender de duas etapas consecutivas: redução do  $\text{O}_2$  molecular a  $\text{O}_2^-$ , seguida pela dismutação espontânea ou catalisada de  $\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A enzima superóxido dismutase catalisa  $\text{O}_2^-/\text{HO}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O peróxido de hidrogênio pode ser diretamente tóxico ao patógeno e está envolvido no fortalecimento da parede celular e no processo de biossíntese da lignina. Atua também como mensageiro secundário, sendo responsável pela ativação da hidrolase do ácido benzóico, enzima responsável pela conversão do ácido benzóico em ácido salicílico. EAOs são altamente reativas e tóxicas à célula e para o invasor, sendo rapidamente retirada do meio pelas enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases (SODs), enzimas do ciclo do ascorbato/glutathiona, catalase e  $\beta$ -caroteno. As SOD podem estar ligadas a um metal (Cu/Zn, Mn e Fe), presentes no citosol, cloroplasto e mitocôndrias. O ciclo do ascorbato ou glutathiona é o principal sistema de remoção de EAOs no cloroplasto. Estão envolvidas nesse ciclo as seguintes enzimas: ascorbato peroxidase, deidroascorbato redutase, monodehidroascorbato redutase e glutathiona redutase. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser reduzido e removido pela ascorbato peroxidase através do ascorbato como redutor, formando o radical monodeidroascorbato. Esse por sua vez, irá dismutar para deidroascorbato e ascorbato. Catalases são enzimas que convertem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2^-$ , presentes nos peroxissomas e glicossomas. As catalases são as principais enzimas de detoxificação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em plantas e podem dismutar diretamente o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico. O  $\beta$ -caroteno é eficiente agente de detoxificação de  $^1\text{O}_2$ . Participa no sistema de antenas dos cloroplastos, na absorção de luz e transferência de energia para os centros das reações (RESENDE et al., 2003).

ALVAREZ et al. (1998) trabalhando com *Arabidopsis*, observaram que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  acumulou-se nas folhas, em pequenos grupos de células, após a inoculação com agente avirulento de *P. syringae*. Este acúmulo ocorreu dentro de duas horas depois da explosão oxidativa inicial no tecido inoculado, seguido pela formação das lesões microscópicas de resposta de hipersensibilidade. Usando a catalase para retirar o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou o DPI (difenilenoiodonium) para inibir a oxidase do NADPH, demonstrou-se que as explosões oxidativas preliminares e secundárias são requeridas para o início da RSA. Os autores propõem que as micro explosões oxidativas em espécies reativas de oxigênio podem ativar respostas da defesa e contribuir para a RSA.

Entretanto, a RSA nem sempre está relacionada com a resposta de hipersensibilidade, pois IRITI & FAORO (2003) observaram que a resposta no processo de

indução por ASM em feijoeiro limitou-se ao acúmulo de  $H_2O_2$  e pelo aumento da atividade da peroxidase, sendo que a produção desses compostos limitaram o crescimento de *Uromyces appendiculatus*.

Embora a resposta de hipersensibilidade (RH) seja considerada uma das respostas de defesa mais importantes, outros mecanismos de defesa podem ocorrer sem que haja a “RH”, como acúmulo de fitoalexinas, aumento da rigidez da parede celular, síntese de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede fúngica e a síntese de proteínas relacionadas à patogenicidade (LAMB et al., 1989; HEIL & BOSTOCK, 2002). Entre as respostas mais conhecidas na expressão da RSA, está a síntese de fitoalexinas e de proteínas-RPs, sendo que as fitoalexinas atuam localmente e as proteínas caracterizam-se pela ação local e sistêmica (HEIL & BOSTOCK, 2002).

Comprovadamente a RSA é dependente da ativação e aumento do AS que é produzido localmente ou sistemicamente na planta (BOSTOCK, 2005) e atua como molécula sinal desencadeando respostas locais e sistêmicas de defesa, possui ação na inibição da catalase e na modificação do balanço redox celular (SOBRINHO et al., 2005). Em 1979, White, citado por DURRANT & DONG (2004), observou que o acúmulo das proteínas-RPs relacionadas a resistência obtida ao TMV em tabaco pode ser induzido por tratamentos com ácido salicílico, aspirina (ácido acetilsalicílico) ou ácido benzóico. Similarmente a aplicação de AS em várias espécies também induziu a expressão de genes RSA (STICHER, et al., 1997). VAN LOON et al. (1998) realizaram o primeiro estudo demonstrando a relação entre AS e RSA, e sugeriram que o acúmulo de etileno induzido por proteínas-RPs é mediado, na planta, pela síntese de compostos aromáticos que imitam a ação do AS. Somente em 1990 dois laboratórios, trabalhando independentemente, postularam que AS pode ser um sinal endógeno para RSA. Esta hipótese foi baseada na observação que os níveis endógenos do AS aumentaram localmente e sistemicamente nas plantas de fumo inoculadas com TMV (MALAMY et al., 1990). O AS aumentou também no floema de pepino infectado antes da expressão da RSA (METRAUX et al., 1990). A importância do AS na tradução do sinal da RSA foi verificada usando transgênicos de fumo e Arabidopsis, com uma super expressão da AS-hidroxilase, uma enzima envolvida no metabolismo do naftaleno e de catalização na conversão do AS ao catecol RSA-inativo. Nas plantas transformadas com o gene de NahG (Naftaleno hidroxilase – G), os níveis do AS foram baixos e a RSA foi obstruída, o que indica que o AS é requerido para a indução da RSA (GAFFNEY et al., 1993). Uma evidência adicional para o papel do AS na RSA foi observado em um trabalho com plantas modificadas de Arabidopsis. O transgênico cim3 exibiu imunidade constitutiva ao patógeno virulento sem nenhuma lesão detectável, acumulou



níveis constitutivos dos mRNAs para os marcadores PR-1, PR-2 e PR-5 da RSA, assim como níveis elevados de AS livre e conjugado (RYALS et al., 1996). Em pepino, marcou-se o AS, com o uso de C<sup>14</sup>, e acompanhou-se sua movimentação a partir do seu precursor o ácido benzóico, após o tecido do cotilédone ter sido inoculado com o vírus da necrose do tabaco. O AS-C<sup>14</sup> foi detectado na primeira folha da planta 2 dias após a inoculação e a RSA pode ser detectada 3 dias após a inoculação (MOLDERS et al., 1996). Frutos de kiwi tratados com AS apresentaram aumento na atividade da PAL e da peroxidase (POOLE et al., 1998), evidenciando alterações metabólicas do metabolismo secundário.

Estudos indicam que a cascata sinalizadora dependente de ácido salicílico possui bifurcação, sendo que um dos braços ativaria proteínas-RPs, atuando na resistência contra fungos e bactérias, enquanto que outro braço ativaria uma oxidase mitocondrial alternativa, com função de controlar os níveis de EAOs, com atuação no controle de vírus (MURPHY et al., 2001).

O ácido salicílico é sintetizado via chiquimato. O aminoácido fenilalanina é convertido em ácido cinâmico o qual pode ser transformado em ácidos orto-cumárico ou benzóico. Ambos os compostos são precursores do AS, dependendo da espécie e do tecido (STICHER et al., 1997). Duas enzimas chaves estão envolvidas no metabolismo do ácido salicílico: a ácido benzóico 2-hidrogenase, que converte ácido benzóico a ácido salicílico e a UDP-glucose: AS glucosiltransferase, que catalisa a conversão de ácido salicílico a ácido salicílico glucosídeo (LEE et al., 1995). Estudos sugerem que pode ocorrer a conversão de AS para o composto volátil metil salicilato, o qual poderia induzir a resistência não somente nas partes da planta não inoculada, bem como em plantas próximas (HENNIG et al., 1993).

Estudos sugerem que o sinal da RSA seja conduzido pelo floema (DURRANT & DONG, 2004). Quando testado em Arabidopsis, observou-se que o movimento da sacarose radioativa marcada não combinou exatamente com a acumulação do RSA, do AS, ou da expressão de PR-1 (KIEFER & SLUSARENKO, 2003). A indução da RSA foi observada fora do movimento normal fonte-dissipador do floema. Parece provavelmente que o floema é a canalização principal para os sinais da RSA, mas alguma fração do sinal pode também mover-se por uma rota diferente (DURRANT & DONG, 2004).

### **2.3.2. Mecanismos envolvidos na Resistência Sistêmica Adquirida**

Entre os mecanismos envolvidos na resistência sistêmica adquirida são conhecidos a resposta de hipersensibilidade (LEE et al., 1995; DURRANT & DONG, 2004); alterações estruturais como lignificações, deposição de calose e formações de papilas (STICHER et

al., 1997); acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade (LEE et al., 1995; DURRANT & DONG, 2004); fenilpropanóides, produtos do metabolismo secundário, como fitoalexinas e compostos fenólicos (LEE et al., 1995), e ativação de enzimas chaves como as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (PAL) (CAVALCANTI et al., 2005).

A resposta de hipersensibilidade (RH) é caracterizada pela morte programada das células em torno da infecção e atua contra patógenos biotróficos, pois restringe o acesso à água e nutrientes, sendo ativada pelo sinal do AS (GLAZEBROOK, 2005) e é um dos caminhos de indução da planta à produção de proteínas relacionadas à patogenicidade (GRÜNER et al., 2003). Se a resposta de hipersensibilidade tiver sucesso, uma pequena região do tecido morto permanece no local do ataque do patógeno, mas o restante da planta não é afetado (TAIZ & ZEIGER, 2004). A RH está associada com a RSA (RYALS et al., 1996), pois em pepinos infectados com isolados avirulentos de *Colletotrichum lagenarium* ocorreu a RH após a penetração do tubo germinativo do patógeno avirulento e quando outra folha da mesma planta foi inoculada com o mesmo fungo, apresentou respostas de lignificação da parede celular da epiderme sobre o apressório e o fungo não conseguiu penetrar na célula (HAMMERSCHMIDT & KUC, 1982).

O processo de lignificação é um importante mecanismo de defesa relacionado a RSA (STICHER et al., 1997). A lignina é formada pela polimerização de precursores produzidos na rota dos fenilpropanóides, sendo iniciada pela deaminação da fenilalanina para ácido cinâmico e catalizada pela enzima fenilalanina amônia-liase. Outras enzimas na rota dos fenilpropanóides, como a álcool-cinamil-desidrogenase, a 4-cumarato e a peroxidase estão envolvidas em reações de resistência e lignificação (STICHER et al., 1997). Vesículas armazenadoras de fenóis migram em direção à parede celular, onde ocorre a descompartimentalização dos fenóis das porções glicosídicas. Os fenóis livres sofrem oxidação, ligação à parede celular ou são polimerizados, sendo que a ação do  $H_2O_2$  catalisada por uma peroxidase sobre os alcoóis 4-coumaril, coniferil e sinapil leva à geração de radicais livres e à formação de lignina (LABANCA, 2002). A lignina pode atuar em diferentes mecanismos, como no estabelecimento de barreiras mecânicas ao avanço e ao crescimento do patógeno; na modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas, no aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas por patógenos e impedindo que nutrientes do tecido hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (PASCHOLATI & LEITE, 1994). Sua resistência física coíbe seu consumo pelos herbívoros e sua estabilidade química torna-a relativamente indigerível por esses animais. Por sua capacidade de ligação com a celulose e as proteínas, a lignina também reduz a digestibilidade dessas substâncias (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A formação de papilas e calose, como estruturas de resistência, formadas em resposta a RSA são confirmadas em inúmeros trabalhos. Papilas em batatas (STROEMBERG & BRISHAMMAR, 1993), pepinos (STUMM & GESSLER, 1986) e cevada (SAHASHI & SHISHIYAMA, 1986) e calose em *Arabidopsis* (DIETRICH et al., 1994). A formação de papilas lignificadas em folhas de trigo dificultou a penetração de várias espécies de fungos, entre eles *Botrytis cinerea* (RIDE, 1980).

As proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-RPs) foram descritas pela primeira vez em 1970 por Van Loon, que observou o acúmulo de proteínas incomuns após infecção de plantas de fumo com o vírus TMV (DURRANT & DONG, 2004). Elas foram inicialmente definidas como proteínas ácidas, de baixo peso molecular, resistentes a proteases, solúveis em ácidos e localizadas nos espaços extra-celulares, sendo mais tarde identificadas também nos vacúolos. As proteínas-RPs presentes nos vacúolos geralmente exercem um efeito de defesa após a descompartimentalização das células, enquanto que as proteínas-RPs extracelulares atuam diretamente em contato com o patógeno no processo de penetração do tecido (STICHER et al., 1997). Conforme HEIL & BOSTOCK (2002), o grupo de proteínas ácidas estão predominantemente localizadas nos espaços intercelulares, enquanto que as básicas, com peso molecular e seqüência de aminoácidos diferentes, estão no espaço intercelular e no vacúolo, sendo que esses dois grupos atuam com função similar. As proteínas-RPs possuem um peptídeo-sinal na região N-terminal, responsável pela sua translocação através da membrana do retículo endoplasmático para o vacúolo ou para o espaço intercelular (BOL et al., 1990). Atualmente são classificadas em 17 famílias distintas, baseando-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, relação sorológica ou atividade enzimática ou biológica (GUZZO, 2004). Entre as proteínas-RPs mais pesquisadas estão as  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) e as quitinases (PR-3), que possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos, com atividade aumentada quando as plantas são tratadas com indutores de resistência (LABANCA, 2002). A família PR-2 é constituída por endo- $\beta$ -1,3-glucanas e são agrupadas em pelo menos três classes distintas. As glucanases da classe I são proteínas básicas, localizadas no vacúolo, especialmente na epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas, enquanto que as classes II e III incluem, principalmente as proteínas ácidas extracelulares. Atuam na hidrólise do polímero  $\beta$ -1,3-glucana, componente estrutural da parede celular de muito fungos, particularmente na extremidade de hifas em que a glucana está mais exposta, causando um enfraquecimento da parede, resultando na morte celular dos fitopatógenos. A família PR-3 é constituída por endoquitinases que são agrupadas em seis classes distintas (I,II, IV, V, VI e VII), atuando diretamente nas paredes celulares de

fungos, hidrolisando os polímeros de quitina, enfraquecendo-a e tornando as células osmoticamente sensíveis (GUZZO, 2003).

Além da  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) e quitinases (PR3) a PR-1, PR-4 e PR-5 mostraram atividades antimicrobianas (STICHER et al., 1997). Verificou-se em fumo inoculado por vírus, que as proteínas-RPs são abundantemente acumuladas em torno da infecção, mas também ocorrem em menor proporção, de 5-10%, em outras partes da planta, caracterizando a RSA (STINTZI et al., 1993). As proteínas-RPs associadas a RSA foram descritas em fumo e *Arabidopsis*, sendo a PR1 extracelular a principal proteína induzida durante a RSA, enquanto que em pepinos PR1 foi pouco expressa e a PR8 (quitinase) foi altamente expressa (KESSMANN et al., 1994). Em plantas de fumo modificadas geneticamente ocorreu a expressão da PR1 na RSA contra a infecção de *Peronospora tabacini* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Alexander et al., 1993 citado por STICHER et al., 1997) e em *Arabidopsis* as proteínas PR1, PR2 e PR5 (UKNES et al., 1992; VAN WESS et al., 2000), e em milho PR1 e PR5 (MORRIS et al., 1998).

Em fumo uma única proteínas-RP pode constituir aproximadamente 1% das proteínas solúveis de uma folha infectada, cujo total de proteínas-RPs pode ficar acima de 10% do total de proteínas solúveis. Isso deve ser considerado, principalmente em relação ao desvio metabólico de órgão de crescimento e/ou reprodução da planta para a síntese de enzimas relacionadas à patogenicidade, especialmente em condições limitadas de nitrogênio (HEIL & BOSTOCK, 2002).

As peroxidases são glicoproteínas capazes de catalizar a produção de  $H_2O_2$ , a formação de lignina, incorporação de glicoproteínas à parede celular, destruição peroxidativa do ácido indolilacético e de outros reguladores de crescimento. As peroxidases, bem como outras enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, atuam sobre as EAOs de modo a livrar a célula de seu efeito deletério. As peroxidases não têm relação direta com a RSA, no entanto, a alteração de sua atividade é um indício de alteração do metabolismo da planta, como na formação da lignina pela polimerização de fenóis (LABANCA, 2002).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) possivelmente é a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal, pois está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004). A PAL está localizada nos cloroplastos das células vegetais, principalmente nas membranas dos tilacóides e atua na desaminação da L-fenilalanina, formando ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos

(ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e ligninas (CAVALCANTI et al., 2005).

Os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos atuando em diferentes funções, como na defesa contra herbívoros e patógenos, no suporte mecânico, como atrativos de polinizadores e dispersores de frutos, na proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras. Entre os compostos fenólicos com ação antimicrobiana destacam-se a lignina e os flavonóides. Dentre os flavonóides, os isoflavonóides têm se tornado conhecidos pela sua ação como fitoalexinas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pela planta em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. O modo de ação sobre fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial. As fitoalexinas possuem grande diversidade sendo que mais de 300 tipos já foram caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonóides, luteolinidina, apigenidina e apigeninidina (CAVALCANTI et al., 2005).

## 2.4. QUITOSANA NA DEFESA VEGETAL

A quitina, palavra grega que significa revestimento protetor, é encontrada em invertebrados marinhos, insetos, fungos e levedura. É extraída de exoesqueletos de crustáceos, como o camarão, siri, caranguejo, lagosta e outros. As carapaças de crustáceos contêm de 15-20% de quitina e estima-se que mais de um bilhão de toneladas são produzidas anualmente. A quitina possui estrutura polimérica constituída predominantemente de unidades repetidas de  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose, muito semelhante a celulose, com a diferença que o grupo hidroxila (OH) do C<sub>2</sub> de cada unidade glicosídica, na celulose é substituída pelo grupo acetamida (NHCOCH<sub>3</sub>) na quitina (MATHUR & NARANG, 1990).

A quitosana é obtida a partir da reação de desacetilação parcial da quitina em soluções alcalinas concentradas e é constituída de unidades de  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amido-2-desoxi-D-glicopirranose. A maioria dos grupamentos acetamida (NHCOCH<sub>3</sub>) na quitina, durante a reação de hidrólise alcalina, é transformado, em grupo amino (NH<sub>2</sub>) ao longo da cadeia polimérica. A quitosana é insolúvel em água, porém dissolve-se em soluções ácidas com ácido acético, ácido fórmico e ácidos minerais, tornando-se um polieletrólito catiônico

(MATHUR & NARANG, 1990). A quitosana possui inúmeras aplicações, sendo utilizada na medicina, meio ambiente, alimentação, cosméticos, agricultura, entre outros. Na agricultura seu emprego está tomando importância pela sua atividade antimicrobiana sobre uma enorme diversidade de fitopatógenos (EL GHAOUTH et al., 1992, 1997; REDDY et al., 2000; DEVLIEGHERE et al., 2004). O poder antimicrobiano da quitosana depende de vários fatores como o grau de desacetilização, peso molecular, pH do meio e temperatura (DEVLIEGHERE et al., 2004). Nos EUA estão registrados três produtos a base de quitosana: o Elexa® (0,95% de quitosana), o Hygra Yield Enhancing Seed Treating Agent (2,5% quitosana) e o Yea Poly-D-Glucosamine Solution (2,5% de quitosana) (HIRANO, 1996).

Os mecanismos de ação antimicrobiana da quitosana não estão bem elucidados, mas várias hipóteses têm sido apresentadas. Uma delas defende que a aplicação de quitosana causa uma mudança na permeabilidade celular devido a interação entre a quitosana (com característica policatiônica) e a superfície celular eletronegativa. Essa interação desencadeia um desprendimento de eletrólitos e constituintes de proteínas de ação antimicrobiana (DEVLIEGHERE et al., 2004).

Outro mecanismo mencionado é que quitosana causa mudanças morfológicas, alterações estruturais e desorganização molecular das células do patógeno, refletindo em uma potente ação sobre o invasor (Hadwiger et al., 1986 citado por PRAPAGDEE et al., 2007).

Outros fatores podem estar relacionados com suas propriedades “filmogênicas” ou efeito “coating”, ou seja, a aplicação de quitosana forma uma camada protetora, alterando a atmosfera interna, reduzindo a maturação, limitando a deterioração por agentes fitopatogênicos e prolongando a vida pós-colheita dos frutos e verduras (EL GHAOUTH et al., 1992, 1997; REDDY et al., 2000), com redução da taxa de respiração e atividade da polifenol-oxidase (JIANG & LI, 2001). Trabalhos histoquímicos em alguns patógenos demonstraram que a atividade antifúngica de quitosana é devido à deposição desta molécula dentro das células fúngicas impedindo o crescimento do patógeno (HARDWIGER et al., 1981).

A hipótese que apresenta maior viabilidade está relacionada à indução de resistência. Nesse processo 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 a proteinases, alterar o metabolismo das fitoalexinas, promover a lignificação (TERRY & JOYCE, 2004), induzir a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BAÑOS

et al., 2006), ativar as enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (EL GHAOUTH et al., 1992; ZHANG & QUANTICK, 1998), fenilalanina amônia-liase (ROMANAZZI et al., 2002) 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 (BHASKARA-REDDY et al., 1998).

SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN (1998) observaram que além da atividade da quitinase e da glucanase há um aumento nas concentrações de ácido salicílico em folhas tratadas com quitosana. Isso demonstra que a quitosana atua na RSA. A quitosana tem mostrado induzir resposta de defesa em plantas, incluindo a síntese de calose, produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), realçando a transcrição e tradução de genes de defesa e codificando proteínas relacionadas à patogenicidade e fitoalexinas (AGRAWAL et al., 2002). Conforme ZHANG & QUANTICK (1997), a quitosana atua induzindo o acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade e síntese de fitoalexinas, além de formar um filme semipermeável, modificando a atmosfera ao redor do produto e com isso diminuindo a taxa respiratória e a transpiração dos frutos. Segundo DEVLIEGHIERE et al. (2004), a quitosana pode atuar de 3 formas distintas na defesa vegetal: (1) inibe o crescimento de fungos, principalmente aqueles que possuem quitina na constituição da parede; (2) induz a quitinase e (3) elicit a formação de fitoalexinas.

Na fruticultura o uso da quitosana foi avaliado em diversas espécies como em citros, cuja aplicação inibiu o crescimento de *Penicillium digitatum* (EL-GHAOUTH et al., 2000), e apresentou potencial no controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros, sendo observado aumento da atividade das enzimas quitinases, glucanases, peroxidases e polifenoloxidase (RAPPUSI-DA-SILVA, 2006). A utilização em *Dimocarpus longan*, na concentração de 0,5, 1 e 2% reduziu a respiração, a perda de massa dos frutos, afetou a atividade da polifenol oxidase e atuou sobre a coloração dos frutos (JIANG & LI, 2001). O uso de quitosana nas concentrações de 1, 2 e 4% reduziu significativamente a severidade de antracnose em frutos de mamão, sendo que a 4% reduziu também a incidência da podridão. Nas concentrações de 2 e 4% os frutos não amadureceram normalmente, permanecendo com coloração da casca verde até o final do amadurecimento, sendo no entanto, recomendado pelos autores a concentração de 1% como opção viável para tratamento pós-colheita de mamão (CIA, 2005). Em maçãs, quitosana inibiu *P. expansum* e *B. cinerea* (EL-GHAOUTH et al., 2000). Em morangos, aplicações pré-colheita e pós-colheita de quitosana reduziram podridões causadas por *B. cinerea*, além de manter maior firmeza dos frutos retardando a maturação (REDDY et al.,

2000). O efeito da redução de podridões em morangueiro sobre *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* também foi observado por EL GHAOUTH et al., (1992). O efeito antimicrobiano de quitosana foi relatada em morangos minimamente processados (DEVLIEGHERE et al., 2004). Em kiwi o uso de quitosana comparado com 3 fungicidas sobre *Botrytis cinerea*, mostrou-se com limitada eficiência, porém *in vitro* teve efeito na redução da taxa de germinação dos esporos, tamanho e crescimento do tubo germinativo (PAK et al., 1998). Em pêssegos, o uso de quitosana em pós-colheita reduziu podridões quando aplicado em concentrações entre 0,25% e 1% (MAZARO et al., 2005). A aplicação de quitosana em videira, em fase pré-colheita, atuou de forma eficiente no controle de *Botrytis cinerea* na cv. Itália na pós-colheita, induzindo a maior atividade da enzima PAL (ROMANAZZI et al., 2002).

Na olericultura quitosana vem sendo largamente estudada, como em alface minimamente processada, aonde prolongou a vida pós-colheita, estendendo-se por quatro dias o período de armazenamento (DEVLIEGHERE et al., 2004). 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  $\beta$ -1-3-glucanases) tanto nas raízes como nas folhas, além de não ter causado fitotoxicidade na planta (EL GHAOUTH et al., 1994). Em pimenta, o uso de quitosana sobre *Botrytis cinerea* causou severos danos citológicos a hifa, inibindo a habilidade do patógeno de colonizar os tecidos (EL GHAOUTH et al., 1997).

Quitosana vem sendo testado em outras culturas como em plântulas de arroz, nas quais o uso de quitosana a 1% diminuiu o tamanho de lesões fúngicas em comparação com o controle. Em *Arachis*, quitosana reduziu a germinação de uredosporos de *Puccinia arachidis*, o número de lesões, diâmetro e a esporulação do fungo. Bioquimicamente observou-se atividade da quitinase e da  $\beta$ -1,3-glucanase e aumento nas concentrações de ácido salicílico em folhas tratadas com quitosana (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998). Em painço, formulação de quitosana – Elexa<sup>TM</sup> foi avaliada no tratamento de sementes e aplicação foliar, induzindo a resistência de plantas a *Sclerospora graminicola* (SHARATHCHANDRA et al., 2004). DESCHAMPS (2002) avaliou, entre outros elicitores, a aplicação de quitosana na biossíntese do óleo essencial metil chavicol de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) e observou, incremento na biossíntese do mesmo, bem como aumento da atividade específica da enzima chavicol O-metil transferase e da PAL. Em soja, avaliaram-se concentrações de 0 a 5 mg/mL quitosana sobre *Fusarium solani* e observou-se efeito de todas as concentrações sobre o crescimento do fungo, porém, com as



concentrações mais elevadas ocorreu mudança morfológica nas hifas de *F. solani* (PRAPAGDEE et al., 2007).

Quando avaliada quitosana *in vitro* sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, observou-se seu potencial bactericida (CHUNG et al., 2003), verificado também por NO et al. (2002) sobre quatro bactérias gram-negativas e sete gram-positivas, sendo observada alta atividade antibactericida.

## 2.5. ACIBENZOLAR-S-METIL NA DEFESA VEGETAL

O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM, BTH, CGA 245704, Bion<sup>®</sup>, Actigard<sup>®</sup>), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (TERRY & JOYCE, 2004). Em cafeeiro susceptível a *Hemileia vastatrix*, o uso de acibenzolar-S-metil, induziu a RSA e conferiu proteção à planta (GUZZO et al., 2001). Os mesmos autores observaram, ainda, pela microscopia de fluorescência, que o ASM, aplicado *in vitro*, não interfere na germinação dos esporos e na formação de apressórios de *H. vastatrix*, concluindo que o ASM não possui ação antimicrobiana direta aos patógenos, mas induz a expressão de genes de resistência para a formação de compostos que impedem ou dificultam o estabelecimento ou desenvolvimento destes patógenos.

O composto ASM conferiu proteção em trigo contra *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* (GÖRLACH et al., 1996), em morango contra *Botrytis cinerea* (TERRY & JOYCE, 2000), em fumo contra o vírus TMV e os fungos *Cercospora nicotianae*, *P. tabacina*, *Phytophthora parasitica* e as bactérias *Erwinia carotovora* e *P. syringae* pv. *tabaci* (FRIEDRICH et al., 1996), em *Arabidopsis thaliana* contra o fungo *P. parasitica*, a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* e ao vírus TCV (LAWTON et al., 1996), em tomate contra a bactéria *Clavibacter michiganensis* sbsp. *michiganensis* (BAYSAL et al., 2003), em feijoeiro contra *Uromyces appendiculatus* (IRITI & FAORO, 2003), em melão contra *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizopus* sp. (HUANG et al., 2000).

A aplicação de ASM em tomateiro, induziu a resistência simultânea contra diferentes fitopatógenos e insetos como a larva minadora *Liriomyza* spp. (INBAR et al., 1998), e a mosca branca *Bemisia tabaci* (PASCUAL et al., 2003). No entanto, alguns autores obtiveram indução de resistência à fitopatógenos, e susceptibilidade à insetos quando aplicado ASM, como as observações realizadas por BOSTOCK et al. (2001), os quais

obtiveram resistência em tomateiro contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e susceptibilidade a insetos da família Noctuidae. Observações similares foram registradas por THALER et al. (1999) com as larvas de *Spodoptera exigua* em tomateiro. Essa susceptibilidade à insetos em plantas tratadas com indutores de RSA, possivelmente, é devido ao ASM ser dependente de uma via de sinalização que envolve o ácido salicílico, sendo que esta via é capaz de inibir outra dependente de jasmonatos (BOSTOCK, 1999), onde a produção de inibidores de proteases, enzimas importantes no processo de resistência de plantas à insetos, é dependente dessa via inibida (STICHER et al., 1997), tornando dessa forma a planta susceptível aos insetos.

Em tomateiro, o uso de ASM, no processo de indução do RSA, resultou na formação de caloses e depósito de compostos fenólicos junto às paredes das células do fungo *Fusarium oxysporum* (BENHAMOU & BÉLANGER, 1998). Em cevada pré-tratada com ASM ocorreu a formação de papilas no sítio de infecção de *Blumeria graminis* f.sp.*hordei* (BESSER et al., 2000). O uso de ASM em sementes de *Vigna unguiculata*, protegeu as plântulas de *Colletotrichum destructivum*, apresentando resposta de hipersensibilidade e aumento da atividade da PAL e chalcona isomerase, duas enzimas chaves nas vias biossintéticas de fenilpropanóides e flavonóides, respectivamente (LATUNDE-DADA & LUCAS, 2001). O uso de ASM não mostrou resposta de hipersensibilidade quando aplicado em feijoeiro (IRITI & FAORO, 2003). Conforme os autores, a ação desse indutor contra a ferrugem do feijoeiro limita-se ao aumento da atividade de peroxidases aniônicas, promovido pelo acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A produção dessas enzimas resultou no fortalecimento da parede celular do hospedeiro. Em trigo a aplicação de ASM, no controle de *Blumeria graminis*, induziu a formação de papilas e aumento da atividade da PAL e da peroxidase (STADNIK & BUCHENAUER, 2000). Em cacau, plantas protegidas com ASM, contra *Crinipellis pernicioso* e *Verticillium dahliae* tiveram um aumento na atividade de polifenol oxidase e peroxidase (RESENDE et al., 2002).

O acúmulo de proteínas-RPs também foi observado em tomate pelo uso de ASM, com acúmulo de quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, além de peroxidases e lisozimas (INBAR et al., 1998). Em plântulas de melão tratadas com ASM, foi observado o aumento da atividade das proteínas-RPs quitinases e peroxidases (BUZI et al., 2004).

A aplicação em pré-colheita com ASM, em associação com azistrobina, foi eficaz na proteção dos frutos de mamoeiro em pós-colheita contra antracnose, reduzindo a incidência e severidade de doenças e induzindo os maiores níveis de atividade de proteínas-RPs,  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases (CIA, 2005).

O uso de ASM em trigo sob condições de deficiências de nitrogênio, prejudicou a cultura devido a relocação de fotoassimilados que seriam utilizados para o crescimento e/ou desenvolvimento vegetal e desviados para a síntese de compostos de defesa (HEIL & BOSTOCK, 2002).

Em plantas de feijoeiro o uso do ASM alterou o metabolismo da planta, gerando custo metabólico e redirecionando os fotoassimilados para investir em defesa, a custo de redução da produtividade. Sendo a indução associada a aumentos na atividade de peroxidase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, e proteases, aumento da síntese de ligninas, aumento no teor de proteínas solúveis e açúcares redutores (KUHN, 2007).

HOFFMANN & CARDOSO (2001), preocupados com que o uso do ASM pudesse interferir sobre bactérias simbiotes, e gerar a respectiva redução de sua eficiência pela aplicação do indutor, buscaram analisar o efeito da aplicação do ASM sobre a associação de plantas de soja com o microssimbiontes *Bradyrhizobium elkanii* e *Glomus intraradices*. Os resultados mostraram que ASM somente mostrou efeito inibitório quando aplicado via radicular e que as diferenças observadas entre plantas que receberam o produto via foliar ou via radicular podem ser devidas a não translocação de sinal da parte aérea para a raiz, não ocorrendo restrição de aplicação foliar do produto.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; TAMOGAMI, S.; YONEKURA, M.; KUBO, A. SAJI, H. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**. Paris, v.40, n.12, p.1061-1069, 2002.

ALVAREZ, M.E.; PENNELL, R.I.; MEIJER, P.J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, Cambridge, v.92, p.773-84, 1998.

ANTUNES, L.E.C. **Situação da produção integrada de morango (PIMo) no Brasil**. In: III ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2006, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 167, 2006, v.1. p.101-104.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; GARCÍA-DOMINGUEZ, E.; BARRERA-NECHA, L.L.; REYES-CHILPA, R.; WILSON C.L. Seasonal evaluation of postharvest fungicidal activity of powders

and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v.29, p.81-93, 2003.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; VALLE, M.G.V.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BARKA, E.A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON C.L. Chitosan as a potential natural compound to control pré and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, Oxford, v.25, p.108-118, 2006.

BAYSAL, Ö.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Berlim, v.52, n.6, p.747-753, 2003.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.1203-1212, 1998.

BESSER, K.; JAROSH, B.; LANGEN, G.; KOGEL, K.H. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Molecular Plant Pathology**, London, v.1, n.5, p.277-286, 2000.

BHASKARA-REDDY, B.M.V.; AIT BARKA, E.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Science Technology**, New York, v.8, 33-43, 1998.

BOFF, P.; KRAKER, J.; GERLAGH, M.; KOHL, J. Importância das pétalas no desenvolvimento do mofo-cinzento do morangueiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 28, n.1, p.76-83, 2003.

BOL, J.F; LINTHORST, H.J.M.; CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.28, p.113-138, 1990.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.11-28.

BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, n.2, p.99-109, 1999.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.545-580, 2005.

BOSTOCK, R.M.; KARBAN, R.; THALER, J.S.; WEYMAN, P.D.; GILCHRIST, D. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.103-111, 2001.

BRAHM, R.U.; UENO, B.; OLIVEIRA, R.P. Reação de cultivares de morangueiro ao oídio sob condições de casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.2, p.219-221, 2005.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.152, n.1, p.34-42, 2004.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio ambiente, 2003, 279p.

CARISSE, O.; BOURGEOIS, G.; DUTHIE, J.A. Influence of temperature and leaf wetness duration on infection of strawberry leaves by *Mycosphaerella fragariae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.10, 1120-1125, 2000.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.;

PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.81-124.

CHUNG, Y.C.; WANG, H.L.; CHE, Y.M.; LI, S.L. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. **Bioresource Technology**, Essex, v.88, n.3, p.179-184, 2003.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. Piracicaba, 2005. 187p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

COSTA, H.; VENTURA, J.A. **Manejo Integrado de Doenças do Morangueiro**. In: III ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2006, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 167, 2006, v.1. p.17-28.

COSTA, H.; ZAMBONI, L.; VENTURA, J.A. Manejo Integrado das Doenças do Morangueiro, In: ZAMBONI, L. (Ed.), **Produção Integrada Fruteiras Tropicais**, Viçosa: UFV, 2003, p.131-164.

DESCHAMPS, C. **Regulation of essential oil biosynthesis in basil (*Ocimum basilicum* L)**. Purdue, 2002. 151p. Thesis. Purdue University.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.703-714, 2004.

DIAS, M.S.C.; SILVA, J.J.C.; PACHECO, D.D.; RIOS S.A.; LANZA, F.E. Produção de morangos em regiões não tradicionais, **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n.236, p. 24-33, 2007.

DIETRICH, R.A.; DELANEY, T.P.; UKNES, S.J.; WARD, E.R.; RYALS, J.A., DANGL J.L. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. **Cell**, Cambridge, v. 77, p.565-577, 1994.

DIXON, R.A.; HARRISON M.J.; LAMB C.J. Early events in the activation of plant defence responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.32, p.479-501, 1994.

DUARTE FILHO, J.; ANTUNES, L.E.C.; PÁDUA, J.G. Cultivares, **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n.236, p. 20-23, 2007.

DURRANT, W.E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, p.185-209, 2004.

EIKEMO, H.; STENSVAND A.; TRONSMO, A.M. Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, n.4, p.345-350, 2003.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, p.398-402, 1992.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; GRENIER, J.; NICOLE, B.; ASSELIN, A.; BELANGER, R. Effect of chitosan on Cucumber Plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n.3, p.313-320, 1994.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; WILSON, C.; BEHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v. 12, p.183-194, 1997.

EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J.L.; WILSON, C.L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.19, p.103-110, 2000.

FEYS, B.J.; PARKER, J.E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, Oxford, v.16, n.1, p.449-455, 2000.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.602-606, 2000.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; GUT RELLA, M.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J.-P.; KESSMAN, H.; RYALS, J., A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v.10, n.1, p.61-70, 1996.

GAFFNEY T.; FRIEDRICH L.; VERNOOIJ B.; NEGROTTA D.; NYE G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, v. 261, p.754-756, 1993.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.205-227, 2005.

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K.R. **The Biochemistry and Physiology of Plant Disease**, Columbia: University of Missouri Press, 1986, 433p.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K-H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J., Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p.629-643, 1996.

GRÜNER, R.; STROMPENT G.; PFITZNER, A.P.; PFITZNER, U.M. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.270, p.4876-4886, 2003.

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.11, p.283-332, 2003.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. Piracicaba, 2004. 236p. Tese de doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.

GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.89-94, 2001.



HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, Palo Alto, v.20, p.61-71, 1982.

HARDWIGER, L.A.; BECKMAN, J.M.; ADAMS, M.J. Localization of fungal components in the Pea-Fusarium interactions detected immuno-chemically with anti-chitosan and anti-fungal cell wall antisera. **Plant Physiology**, Rockville, v.67 p.170-175, 1981.

HEIL, M.; BOSTOCK, M.R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, London, v.89, p.503-512, 2002.

HELBIG, J. Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 265-273, 2001.

HENNIG J.; MALAMY J.; GRYNKIEWICZ G.; INDULSKI J.; KLESSIG D.F. Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p.593-600, 1993.

HIRANO, S. Chitin Biotechnology applications. **Biotechnology Annual Review**, Amsterdam, v.2, p.237-258, 1996.

HOFFMANN, L.V.; CARDOSO, E.J.B.N. Inibição da colonização por *Bradyrhizobium elkanii* mas não por *Glomus intraradices* em soja pelo ativador de defesa vegetal BTH. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.4, p.795-799, 2001.

HUANG, Y.; DEVERALL, B.J.; TANG, W.H.; WANG, W.; WU, F.W. Foliar application of acibenzolar-S-methyl and protection of postharvest Rock melons and Hami melons from disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, p.651-656, 2000.

INBAR, M.; DOOSTDAR, H.; SONODA, R.M.; LEIBEE, G.L.; MAYER, R.T. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.24, n.1, p.135-149, 1998.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.151, n.3, p.171-180, 2003.

JALALI, B.L.; BHARGAVA S.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, p.65-74, 2006.

JANISIEWICZ, W.J. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonist used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, p.473-479, 1996. 1996.

JIANG, Y., LI, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, United Kingdom, v.73, p.139-143, 2001.

KATZ, V.A.; THULKE, O.U.; CONRATH, U. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, p.1333-1339, 1998.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p.439-59, 1994.

KIEFER I.W.; SLUSARENKO, A.J. The pattern of systemic acquired resistance induction within the *Arabidopsis* rosette in relation to the pattern of translocation. **Plant Physiology**, Rockville, v.132, p.840-847, 2003.

KUC, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. **Crop protection**, Oxford, v.19, p.859-861, 2000.

KUHN, 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**. Piracicaba, 2007, 140p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

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*)**. Piracicaba, 2002. 107p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M.; DIXON, R.A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v.56, p.215-224, 1989.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.58, p.199-208, 2001.

LAWTON, K.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v.10, p.71-82, 1996.

LEANDRO, L. F. S.; GLEASON, M. L.; NUTTER F. W.; WEGULO, S. N., DIXON, P. M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 7, p. 659-664, 2001.

LEE H.I.; LEON J.; RASKIN I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 92, p.4076-4079, 1995.

LEITE, B.; RONCATO, L.D.B.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.235-280, 1997.

LOPEZ, A.M. Q. **Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. Em sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench))**. Rio Claro, 1991, 203p. Dissertação (mestrado) – Faculdade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”.

MAAS, J.L. **Compendium of strawberry diseases**. 2 ed. St. Paul: APS Press, 98p., 1998.

MALAMY J.; CARR J.P.; KLESSIG D.F.; RASKIN I. Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, v. 250, p.1002-1004, 1990.

MATHUR, N. K.; NARANG, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, Easton, v.67, n.11, p.938-942, 1990.

MAZARO, S.M.; GOUVEA A.; CITADIN, I. Qualidade pós-colheita de pêssegos cv. Flôr da Prince em função da aplicação de quitosana em condições ambientais. Congresso Ibero-americano de Tecnologia Pós-colheita e Agroexportação, 4., 2005, Porto Alegre, **Anais eletrônicos...** Porto Alegre, 2005, 1 CD-ROM.

METRAUX, J.P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W.; INVERARDI B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, v. 250, p.1004-1006, 1990.

MOLDERS, W.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P. Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p.787-792, 1996.

MORRIS, S.W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARRETT, M.; THOMAS, S.; WITSE, C.C.; FREDERIKSEN, R.A.; BHADHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced resistance responses in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.11, n.7, p.643-658, 1998.

MURPHY, J.F.; GILLILAND, A.; WONG, C.E.; WEST, J. SINGH, P.; CARR, J.P. Signal transduction in resistance to plant viruses. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.1, p.121-128, 2001.

NO, H.K.; PARK, N.Y.; LEE, S.H.; MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.74, p.65-72, 2002.

OLIVEIRA, M.A.C.; SANTOS, A.M. Classificação, Botânica, Origem e Evolução. In: SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. (Eds.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.40-41,(Frutas do Brasil, 40).

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; WREGE, M.S.; UENO, B.; CASTRO, L. A. S. **Otimização da produção nacional de mudas de morangueiro**, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 162, 2006, 28 p.

PAK, H.A.; RASIM, S.; MANNING, M.A.; FULLERTON, R.A. Soft fungicides for the control of *Botrytis cinerea* in vitro and in vivo on kiwifruit. Proc. 51<sup>st</sup> N.Z. **Plant Protection Conference**, p.123-129, 1998.

PARIKKA, P.; LEMMETTY, A. Tracing latent infection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry by PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 393–398, 2004.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, cap.22, 1995, p.417-454.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.1-51, 1994.

PASCUAL, S.; NOMBELA, G.; AVILES, M.; MUÑIZ, M. Induced resistance in tomato to whitefly *Bemisia tabaci* by Bion. **International Organization for Biological Control IOBC/WPRS Bulletin**, v.26, n.10, p.61-64, 2003.

PAULUS, A.O. Fungal diseases of strawberry. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.8, p.885-889, 1990.

PICCINI, E. **Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus spp.*) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos**. Piracicaba, 1995. 107p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

POOLE, P.R.; McLEOD, L.C.; WHITMORE, K.J.; WHITAKER, G. Periharvest control of *Botrytis cinerea* roset in stored kiwifruit. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.464, p.71-76, 1998.

PRAPAGDEE, B.; KOTCHADAT, K.; KUMSOPA, A.; VISARATHANONTH, N. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. **Bioresource Technology**, Essex, v.98, n.7, p.1353-1358, 2007.

RAPPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita.** Piracicaba, 2006, 82p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

REDDY, M.V.B.; BELKACEMI, K.; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays in post-harvest infections by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.20, p.39-51, 2000.

REICHERT, L.J.; MADAIL, J.C. de M., Aspectos Socioeconômicos. In: SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. (Eds.). **Morango: produção.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.12-15. (Frutas do Brasil, 40).

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Berlim, v.51, n.5, p.621-628, 2002.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.123-130, 2003.

RIDE, J.P. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. **Physiological Plant Pathology**, Palo Alto, v.16, p.187-196, 1980.

RIGON, L.; CORRÊA, S.; REETZ, E.; VENCATO, A.; ROSA, G.R.; BELING, R.R. Pequenas frutas. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**, Santa Cruz do Sul, v.1, n.1, p.90-97, 2005.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; VENERE, D.I.; SALERNO, M. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v.67, p.1862–1867, 2002.

RYALS J.; NEUENSCHWANDER U.; WILLITS M.; MOLINA A.; STEINER H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 8, n.10, p.1809-1819, 1996.

SAHASHI, N.; SHISHIYAMA, J. Increased papilla formation, a major factor of induced resistance in the barley *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* system. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 64, p.2178-2181, 1986.

SANTOS, A.M. Cultivares. In: SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. (Eds.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.24-30. (Frutas do Brasil, 40).

SATHIYABAMA M.; BALASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection**, Oxford, v.17, n.4, p.307-313, 1998.

SEAB. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/SEAB>>. Acesso em: 01 maio 2007.

SESA, SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos no Estado do Paraná**, junho de 2001 à julho de 2002/Secretaria de Estado da Saúde – Curitiba: SESA, 2003, p.55.

SHARATHCHANDRA, R.G; NIRANJAN-RAJ, S.; SHETTY, N.P; MRUTHESH, K.N; SHETTY, H.S. A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. **Crop Protection**, Oxford, v.23, n.10, p.881-888, 2004.

SILVA, A.F.; DIAS, M.S.C.; MARO, L.A.C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n.236, p. 7-13, 2007.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.; CAVALCANTI, L.S. **Indutores abióticos**. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.51-80.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.57, p.25-34, 2000.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

STINTZI, A; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v.75, p.687-706, 1993.

STROEMBERG, A; BRISHAMMAR, S. A histological evaluation of induced resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.137, p.15-25, 1993.

STUMM D.; GESSLER, C. Role of papillae in the induced systemic resistance of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p.405-410, 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**; Tradução: SANTAREM et al., 3º ed., Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

TANAKA, M.A.S. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em morangueiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA H. (Eds.) **Controle de Doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: UVF, 2002, p.69-140.

TANAKA, M.A.S; PASSOS, F. A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. Fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 27 n. 5., p. 484-488, 2002.

TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.), **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p.489-499.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C., Suppression of grey mould on strawberry fruit with the chemical plant activator acibenzolar. **Pest Management Science**, Hoboken, v.56, p.989-992, 2000.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004.



THALER, J.S.; FIDANTSEF, A.L.; DUFFEY, S.S.; BOSTOCK, R.M. Tradeoffs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration using chemical elicitors of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.25, p.1597-1609, 1999.

UKNES, S.; MAUCH-MANI B.; MOYER, M.; POTTER, S.; WILLIAMS S.; DINCHER, S.; CHANDLER, D.; SLUSARENKO, A.; WARD, E.; RYALS, J. Acquired resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v.4, p.645-656, 1992.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science Society of America**, Madison, v.44, p.1920-1934, 2004.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE C. M. J. Systemic resistance induced by Rhizosphere bacteria. **Annual Reviews Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.453-483, 1998.

VAN WESS, S.C.M.; SWART, E.A.M.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, v.97, p.8711-8716, 2000.

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 Tecnology**, Amsterdam, v.12, 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**, Ashford, v.73, p.763-767, 1998.

### 3- CAPITULO II - INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS FOLIARES E DE FLORES EM MORANGUEIRO POR QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METIL

**RESUMO:** A indução de resistência em plantas a patógenos com a utilização de indutores está sendo amplamente estudada considerando a demanda por frutos mais saudáveis. Assim sendo, foram desenvolvidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos – PR, nos anos de 2004 e 2005, dois experimentos com objetivo de avaliar os indutores de resistência quitosana e Acibenzolar-S-Metil (ASM) sobre o desenvolvimento das doenças mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) e a flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) em morangueiro, relacionando com a ação bioquímica e a resposta de defesa vegetal. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições contendo 16 plantas por parcela. Foram avaliadas três concentrações de quitosana (0,5, 1,0 e 2,0%) e uma concentração de ASM (0,0025%) em relação à testemunha (água destilada) e o tratamento controle com aplicação de fungicidas. A frequência de aplicações dos produtos foi de sete dias, totalizando 20 aplicações no ciclo. O uso dos indutores não interferiu na produtividade e na massa média dos frutos. Quitosana e ASM atuaram sobre a redução da mancha-de-micosferela, mancha-de-dendrofoma e flor-preta em morangueiro. O uso dos indutores interferiu nos parâmetros bioquímicos foliares de aminoácidos, açúcares totais, açúcares redutores e fenóis totais mantendo os valores das médias das avaliações superiores à testemunha. As peroxidases, as  $\beta$ -1,3-glucanases e as quitinases foram ativadas pelo uso dos indutores, sendo as  $\beta$ -1,3-glucanases pronunciada nas primeiras 120 horas após a aplicação dos indutores e as quitinases a partir de 168 horas da indução.

**Palavras-chave:** *Fragaria x ananassa*, proteínas-RPs, ASM, *Mycosphaerella fragariae*, *Dendrophoma obscurans*, *Colletotrichum acutatum*.

### INDUCTION OF RESISTANCE ON LEAF AND FLOWER DISEASES IN STRAWBERRY PLANTS BY CHITOSAN AND ACIBENZOLAR-S-METHYL

**ABSTRACT:** The induction of plant resistance against pathogen by inductors has been widely studied due to increasing demand for healthy fruits. This work was carried out in 2004 and 2005 at Federal Technological University of Paraná State located in Dois Vizinhos - PR, with the objective of evaluating the induction of resistance to chitosan and Acibenzolar-S-

Methyl (ASM) in disease development of strawberry plants against mycosphaerella blight (*Mycosphaerella fragariae*), dendrophoma blight (*Dendrophoma obscurans*) and black flower rot (*Colletotrichum acutatum*). The experimental design used was a randomized block with four replications containing 16 plants each. The effect of the elicitor quitosana (0.5, 1.0 and 2.0%) and ASM (0.0025%) was evaluated in relation to control plants (distilled water only) and those with fungicides application. The frequency of applications of the products was at each seven days, totalizing 20 applications. The use of inductors did not decrease the productivity or fruit average fresh weight. Chitosan treatment and ASM had acted on the reduction of mycosphaerella blight, dendrophoma blight and black flower rot in strawberry plants. Plant treatment with inductors also resulted in leaf biochemical parameters changes where amino acids, total sugar, reducing sugars and total phenol concentrations higher than in control plants. The use of inductors has activated the peroxidases,  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases, being the activity of  $\beta$ -1,3-glucanases great during the first 120 hours and quitinases after 168 hours of inductors application.

**Keywords:** *Fragaria x ananassa* Duch, PRs-protein, elicitor, ASM, *Mycosphaerella fragariae*, *Dendrophoma obscurans*, *Colletotrichum acutatum*.

### 3.1. INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) apresenta alta suscetibilidade a diversas doenças, e o clima nas principais regiões produtoras é extremamente favorável ao desenvolvimento da maioria dos patógenos. O clima aliado ao cultivo intensivo, ausência de cultivares resistentes e práticas culturais inadequadas torna imprescindível o uso de fungicidas (COSTA et al., 2003). No entanto, a crescente preocupação com a qualidade ambiental e padrões de produção agrícola, além do aumento da demanda por produtos saudáveis, tem levado à busca de informações por práticas de produção favoráveis à conservação e qualidade do meio ambiente (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003). Neste contexto, vêm se destacando métodos de controle alternativos de doenças em plantas, como o uso de indutores ou elicitores com objetivo de induzir a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA).

A RSA pode ser conceituada como um mecanismo de defesa induzido por agentes bióticos ou abióticos ou infecção localizada por patógenos, que conferem proteção à planta a um amplo espectro de microorganismos (DURRANT & DONG, 2004). A quitosana é um indutor orgânico, obtida a partir da reação de desacetilação parcial da quitina, substância essa encontrada em invertebrados marinhos, insetos, fungos e leveduras (MATHUR &

NARANG, 1990). O uso de quitosana na agricultura está tomando importância pela sua atividade elicitora sobre uma enorme gama de plantas, sendo esse efeito observado em morangueiro por diversos pesquisadores (EL GHAOUTH et al., 1992; REDDY et al., 2000; DEVLIEGHERE et al., 2004). A quitosana atua na RSA com ativação da rota do ácido salicílico e ativação de proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-RPs) (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998), como as quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (EL GHAOUTH et al., 1992; ZHANG & QUANTICK, 1998), fenilalanina amônia-liase (PAL) (ROMANAZZI et al., 2002) e peroxidases (ZHANG & QUANTICK, 1997). A quitosana inibe a proteínases, altera o metabolismo das fitoalexinas, promove a lignificação (TERRY & JOYCE, 2004), atua na síntese de calose, produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), realça a transcrição e tradução de genes de defesa (AGRAWAL et al., 2002), induz a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006), além de atuar na inibição de enzimas de desestruturação da parede como a poligalacturonases, pectinases e celulases (BHASKARA-REDDY et al., 1998).

O composto sintético acibenzolar-S-metil (ASM) é um análogo do ácido salicílico, e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (TERRY & JOICE, 2004). Atua no acúmulo de proteínas-RPs, como as quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, peroxidases (INBAR et al., 1998), PAL e chalcona isomerase, além de promover resposta de hipersensibilidade (LATUNDE-DADA & LUCAS, 2001), formação de papilas (BESSER et al., 2000) caloses e depósito de compostos fenólicos (BENHAMOU & BÉLANGER, 1998).

Por mais que se conheçam, no meio científico, os efeitos indutores de quitosana e ASM, os trabalhos em morangueiro são limitados, e esses indutores não chegam a ser utilizados por produtores, seja pela carência de informações científicas que justifiquem seu emprego ou pelo desconhecimento de sua ação protetora. Dessa forma, necessita-se de trabalhos que contribuam com informações que relacionem o uso desses indutores com respostas agrônômicas, bioquímicas e fisiológicas, para que em um futuro próximo se possa conhecer sua forma de ação e potencial de uso na cultura do morangueiro.

O objetivo desse trabalho foi de avaliar o efeito dos indutores de resistência quitosana e do acibenzolar-S-metil (ASM) sobre o desenvolvimento das doenças do morangueiro mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) e a flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) e verificar, através de análises bioquímicas foliares a ativação de compostos relacionados à patogênese.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Experimento 1:**

#### **3.2.1.1. Experimento em campo**

O experimento foi conduzido em 2004 na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos – PR, situada a 25°, 42' S e 53°, 03' W, a 519 metros de altitude. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférico Típico e o terreno apresenta em torno de 3% de declividade média.

A cultivar de morango utilizada foi a Aromas, cujas mudas foram importadas do Chile, sendo o plantio realizado no mês de maio, no espaçamento de 30x30cm entre plantas e quatro fileiras por canteiro. O sistema de condução foi em túnel baixo, com fertirrigação com duas fileiras de tubos gotejadores e com sistema de 'mulching' plástico.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com seis tratamentos em quatro repetições com 16 plantas por parcela. Os tratamentos incluíram 20 aplicações realizadas em intervalos de sete dias, sendo: quitosana nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%, e ASM na concentração de 0,0025%; fungicidas recomendados para a cultura: tiofanato-metílico (0,0049%); iprodione (0,0075%) e folpete (0,00135%) e a testemunha com aplicação de água destilada. A quitosana foi dissolvida em ácido acético 1%, após completa diluição, acrescentou-se água destilada para obter as concentrações finais. A seqüência de aplicação dos fungicidas foi: a primeira aplicação de tiofanato-metílico e nas semanas subseqüentes foi alternado o uso de iprodione e folpete. Não se seguiu com o uso do tiofanato-metílico no decorrer do experimento devido ao período de carência do referido produto ser de 14 dias e as colheitas serem feitas em intervalo médio de três dias.

As avaliações realizadas foram produtividade, massa média de frutos, incidência e severidade de doenças. Após cada colheita, em um total de 29 no ciclo da cultura, os frutos foram transportados até o laboratório da UTFPR – Dois Vizinhos, contados e sua massa determinada em balança de precisão. A produtividade média foi obtida somando-se a massa dos frutos de todas as colheitas e dividindo-se pelo número de plantas da parcela, e a massa média de frutos foi obtida dividindo-se a massa total dos frutos pelo número total de frutos.

### 3.2.1.2. Avaliação das doenças

As avaliações de incidência da mancha-de-micosferela e mancha-de-dendrofoma, nas datas de amostragem (Quadro 3.1), foram realizadas a cada 20 dias. Efetuou-se a contagem do número de folhas com sintomas das doenças, considerando-se as quatro plantas centrais de cada parcela, e a incidência definida pelo percentual de folhas atacadas em relação ao total de folhas das plantas avaliadas. Com base nos dados obtidos foi determinada a área abaixo da curva de progresso da incidência da doença através da seguinte fórmula:  $AACPD = \Sigma[(I_i + I_{i+1})/2 \cdot (T_{i+1} - T_i)]$ , onde  $I_i$  = incidência na época da avaliação  $i$  e  $T_i$  = tempo da avaliação  $i$ .

Para mancha-de-micosferela, além da incidência, foi realizada avaliação da severidade, sendo que em cada uma das plantas avaliadas foram marcadas duas folhas e nestas determinados o número e tamanho das lesões. O tamanho das lesões foi obtido com auxílio de um paquímetro. Com base no diâmetro da lesão foi estimada sua área média. A área total lesionada foi obtida multiplicando-se a área média das lesões pelo número de lesões por folha. A severidade, dada pela percentagem de área foliar lesionada, foi determinada com base na relação entre a área foliar média e área lesionada de cada tratamento em cada época de avaliação. Esta metodologia foi adotada para avaliação da severidade devido à ausência de uma escala diagramática que pudesse ser utilizada no experimento. A área sob a curva de progresso da doença foi determinada pela seguinte fórmula:  $AACPD = \Sigma[(S_i + S_{i+1})/2 \cdot (T_{i+1} - T_i)]$ , onde  $S_i$  = severidade da doença na época da avaliação  $i$ ;  $T_i$  = tempo da avaliação  $i$ .

Para avaliação da antracnose, cujo sintoma é conhecido como flor-preta, foi efetuada a determinação da incidência de sintomas típicos do ataque do patógeno, caracterizado pela necrose do pecíolo, das flores e frutos jovens, deformações em frutos verdes e manchas deprimidas nos frutos maduros (TANAKA & PASSOS, 2002). Foram feitas duas avaliações, sendo a primeira em 01 de novembro e a segunda em 10 de dezembro, quando foram realizadas contagens do número de estruturas com sintomas da doença (pecíolos, flores e frutos), considerando-se as quatro plantas centrais de cada parcela, e a incidência definida pelo percentual total de pecíolos, flores e frutos atacadas em relação ao total das plantas avaliadas.

### 3.2.1.3. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas em tecidos foliares (proteínas totais, aminoácidos, fenóis totais, açúcares totais e redutores) foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Federal do Paraná – Curitiba. Discos foliares foram coletados 24, 72, 120 e

168 h após a aplicação dos indutores (Quadro 3.1). Imediatamente após as coletas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até as avaliações.

Para dosagem de proteínas totais, as amostras de tecido foliar foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 g / 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras foi empregado o teste de BRADFORD (1976). Leitura em espectrofotômetro, modelo UV-1601-Shimadzu à 630 nm, com soro albumina bovina como padrão.

Para a determinação de aminoácidos as amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de ácido sulfosalicílico, seguindo centrifugação por 15 minutos a 3600 g. Utilizaram-se 2 mL do extrato e adicionaram-se 2 mL de ácido acético + 2 mL de ninidrina ácida, deixou-se em banho-maria por 1 hora a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro à 520 nm. As concentrações de aminoácidos foram calculadas através de uma curva padrão de prolina.

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em duas etapas, seguindo o método adaptado de BIELESKI & TURNER (1966). A primeira compreendeu a extração dos fenóis totais, realizada a partir da adição de 4 mL da solução metanol, clorofórmio e água (MCA), na relação 6: 2,5: 1,5 v/v, no material vegetal, com trituração em almofariz à temperatura ambiente, seguida de uma centrifugação a 6000 g por 20 min, sendo coletado o sobrenadante. Posteriormente, foi realizada nova extração do resíduo remanescente, adicionando-se 4 mL de MCA, centrifugando novamente a 6000 g por 20 min e o sobrenadante sendo adicionado ao primeiro, obtendo-se assim o extrato MCA. A esse extrato foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, procedendo-se nova centrifugação a 6000 g por 15 min para separação das fases. A segunda etapa compreendeu a determinação de fenóis totais realizada pelo método adaptado de JENNINGS (1991). A quantificação de fenóis foi feita através de uma curva padrão utilizando tirosina. As amostras foram preparadas a partir da retirada de uma alíquota de 0,5 mL da parte superior do tubo de extração dos fenóis (extrato MCA), a seguir adicionado 0,5 mL de água destilada, mais 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 15 min, foram adicionados 5 mL do reagente alcalino "A" (preparado com carbonato de sódio a 2 % em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N), permanecendo durante 50 minutos até a leitura da absorbância em 760 nm, em espectrofotômetro, modelo UV-1601-Shimadzu. No controle negativo, foi usada água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. O resultado foi expresso em  $\text{mg.g}^{-1}$  de tecido fresco.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS et al. (1956). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Utilizando-se 2  $\mu$ L do extrato e adicionando-se 0,5mL de fenol a 5,0% + 2,5 mL ácido sulfúrico concentrado. A leitura das amostras foi realizada a 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada através de curva padrão de glicose.

Açúcares redutores foi determinados pelo método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 10 mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 10 minutos a 14.000 g a 4°C. Utilizando-se 0,5  $\mu$ L do extrato e adicionando-se 1,0 mL de água destilada + 1,0 mL reagente DNS. A leitura das amostras foi realizada a 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi calculada em função de curva padrão de glicose.

### 3.2.2. Experimento 2:

Para complementação das análises bioquímicas de 2004 o experimento foi repetido com as mesmas características em 2005, sendo os mesmos indutores avaliados, porém com quitosana somente na concentração de 1%. A aplicação dos tratamentos ocorreu 45 dias após o plantio e as amostras foliares também foram coletadas 24, 72, 120 e 168 h após a aplicação dos produtos (Quadro 3.1). As análises da atividade das enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo – Piracicaba. A análise da atividade enzimática das peroxidases foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fitossanidade da UTFPR – Dois Vizinhos.

Para dosagem das atividades de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases as amostras foram maceradas em 4,0 mL de tampão de extração de acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante (extrato protéico) foi coletado e 200  $\mu$ L utilizados para a avaliação da atividade das enzimas.

A atividade enzimática das quitinases foram avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para tanto, 200  $\mu$ L do extrato protéico foram misturados a 600  $\mu$ L do mesmo tampão de extração e a 200  $\mu$ L de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Após incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200  $\mu$ L de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 g por 5 min. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada como referência e os resultados



foram expressos em unidades de absorvância.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>, descontando-se os valores de absorvância do controle (800 µL de tampão de extração + 200 µL de “CM-chitin-RBV”).

Para a determinação espectrofotométrica das atividades de β-1,3-glucanases nos extratos foi utilizado, como substrato uma solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg.ml<sup>-1</sup>, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por WIRTH & WOLF (1992) e com o procedimento descrito por GUZZO & MARTINS (1996). Para tanto, 200 µL do extrato protéico foi misturado com 600 µL do mesmo tampão de extração e 200 µL de CM-curdlan-RBB (4,0 mg.ml<sup>-1</sup>). Após incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 g / 5 min. A absorvância do sobrenadante foi determinada a 600 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>.

A quantificação da atividade das peroxidases foi determinada de acordo com a técnica descrita por MATSUNO & URITANI (1972), padronizada no Laboratório de Bioquímica e Fitossanidade da UTFPR – Dois Vizinhos. As amostras (4 discos foliares de 2 cm de diâmetro – peso médio total de 0,260g) foram maceradas em nitrogênio líquido, e então, adicionaram-se 5 mL de solução extratora – tampão fosfato 0,05 M, pH 7. Adicionaram-se 2 mg de polivinilpirrolidona (PVP 100, marca Sigma); o extrato foi centrifugado por 20 min a 4.000 g em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro recipiente e utilizado como extrato enzimático. A análise de atividade da enzima peroxidase propriamente dita foi realizada seguindo os seguintes passos: em um tubo de ensaio adicionaram-se 5 mL de solução tampão de citrato (pH 5,0), 0,5 mL de água oxigenada a 3 %, 0,5 mL de guaiacol 0,5 % e 3,0 mL da amostra extraída do tampão pH 7. Esta mistura foi levada para incubação em banho maria, por 15 minutos, a 30° C. Após incubação, os tubos voltaram para gelo onde permaneceram por mais 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de bissulfito de sódio, o qual foi usado para paralisar a reação. As leituras foram realizadas após 10 minutos de repouso, em espectrofotômetro, modelo NT – 805 NOVATECNICA, em comprimento de onda de 450 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática considerou-se como uma unidade de enzima correspondente a um aumento na absorvância de 0,001 unidade ótica/minuto.

### 3.2.3. Demonstrativo cronológico dos experimentos

Quadro 3.1. Demonstrativo cronológico do plantio das mudas, início da aplicação dos tratamentos, coleta de tecidos foliares para análises bioquímicas e momentos das avaliações de doenças, para os experimentos 1 (ano 2004) e 2 (ano 2005). UTFPR, Dois Vizinhos, 2004/2005.

<b>Datas</b>	<b>Procedimentos</b>
<b>Ano 2004</b>	
21 Maio	Plantio das mudas
3 Julho	IAP- Início da aplicação dos tratamentos
4 Julho	1º coleta de tecidos foliares (24 horas após a aplicação dos indutores)
6 Julho	2º coleta de tecidos foliares (72 horas após a aplicação dos indutores)
8 Julho	3º coleta de tecidos foliares (120 horas após a aplicação dos indutores)
10 Julho	4º coleta de tecidos foliares (168 horas após a aplicação dos indutores)
1 Setembro	1º avaliação de incidência e severidade de doenças
20 Setembro	2º avaliação de incidência e severidade de doenças
10 Outubro	3º avaliação de incidência e severidade de doenças
01 Novembro	4º avaliação de incidência e severidade de doenças
20 Novembro	5º avaliação de incidência e severidade de doenças
10 Dezembro	6º avaliação de incidência e severidade de doenças
<b>Ano 2005</b>	
22 Maio	Plantio das mudas
4 Julho	Início da aplicação dos tratamentos
5 Julho	1º coleta de tecidos foliares (24 horas após a aplicação dos indutores)
7 Julho	2º coleta de tecidos foliares (72 horas após a aplicação dos indutores)
9 Julho	3º coleta de tecidos foliares (120 horas após a aplicação dos indutores)
11 Julho	4º coleta de tecidos foliares (168 horas após a aplicação dos indutores)

### 3.2.4. Análise estatística dos experimentos

Os resultados obtidos foram submetidos à avaliação de homogeneidade pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade de erro (STEEL et al., 1997). A análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o software SASM Agri (ALTHAUS et al., 2001). As análises de regressões foram feitas pelo programa de análise estatística SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As aplicações dos indutores quitosana e ASM demonstraram não interferir sobre os parâmetros massa média dos frutos e produtividade, não havendo diferenças entre os tratamentos (Tabela 3.1). Isso demonstra que os indutores nas concentrações e frequência de aplicações avaliadas não comprometeram a produtividade com perdas metabólicas, fato possível quando se faz uso de indutores de resistência, devido a desvios de rotas metabólicas para síntese de compostos de defesa (HEIL & BOSTOCK, 2002). Em plantas de feijoeiro o uso do ASM alterou o metabolismo da planta, gerando custo metabólico e redirecionando os fotoassimilados para investir em defesa, a custo de redução da produtividade (KUHN, 2007).

Na avaliação da mancha-de-micosferela (incidência e severidade) e de mancha-de-dendrofoma (incidência), as áreas abaixo das curvas de progresso da doença (AACPD), foram menores quando se utilizou quitosana nas três concentrações e ASM, em comparação com a testemunha (Tabela 3.1).

Tabela. 3.1. Massa média dos frutos (g), produtividade (g.planta<sup>-1</sup>) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para incidência e severidade de mancha-de-micosferela e incidência de mancha de dendrofoma em plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004.

Tratamentos	Massa média (g)	Produtividade (g/ planta)	AACPD		
			Dendrofoma Incidência	Micosferela Incidência	Severidade
Testemunha	11,85 ns*	554,04ns	1032,6a	5095,9a	273,6a
Fungicidas	11,66	571,29	623,1c	1373,4c	33,0c
ASM	11,87	550,03	659,5bc	2294,0bc	86,3bc
Quitosana 0,5%	11,46	563,69	856,0b	2633,2b	93,5b
Quitosana 1,0%	11,78	556,77	674,0bc	2037,8bc	62,0bc
Quitosana 2,0%	11,69	598,12	749,6bc	2260,8bc	63,5bc
C.V.	9,43	12,45	19,52	16,80	36,40

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Nas curvas de progresso da incidência e da severidade da mancha-de-micosferela (Figura 3.1 e Figura 3.2), consegue-se observar claramente o efeito dos indutores e fungicidas sobre a retenção da doença, estando a curva de progresso da testemunha mais elevada e distanciada dos demais tratamentos.

A incidência da mancha-de-micosferela, de modo geral, manteve-se elevada em todos os tratamentos (Figura 3.1), fato normal quando se trata de mancha-de micosferela, pois é a doença do morangueiro de ocorrência mais generalizada, com alta incidência, e podendo ser encontrada em todas as regiões de cultivo (COSTA & VENTURA, 2006). Na primeira avaliação de doenças a incidência se mostrou elevada fato explicável no início do ciclo da cultura devido ao pequeno número de folhas da planta em relação ao número de folhas com a doença. Na segunda avaliação, os valores observados de incidência tiveram um pequeno decréscimo devido à emissão de folhas sadias pela planta. Nas avaliações seguintes ocorreu acréscimo da incidência, voltando a cair nas duas últimas avaliações, com exceção da testemunha (Figura 3.1). Essa redução, no final do ciclo da cultura, foi devido à remoção natural de folhas doentes pela planta, através do seu processo de senescência.

Os valores de severidade para mancha-de-micosferela, de modo geral, foram baixos, não chegando a 5% na testemunha na última avaliação (Figura 3.2), pois segundo MAZARO et al. (2006) a severidade de mancha-de-micosferela, na cultivar Aromas, pode chegar a 34,9%. A baixa severidade, possivelmente deve-se às condições em que foi desenvolvido o experimento, com cultivo protegido e irrigação localizada, as quais não foram favoráveis à infecção e disseminação do patógeno, uma vez que este necessita de no mínimo 12 horas de umidade foliar para que ocorra a infecção (CARISSE et al., 2000). No entanto, mesmo com baixa severidade, foi possível observar o efeito dos indutores, em relação à testemunha, na redução da área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha-de-micosferela (Tabela 3.1 e Figura 3.2).

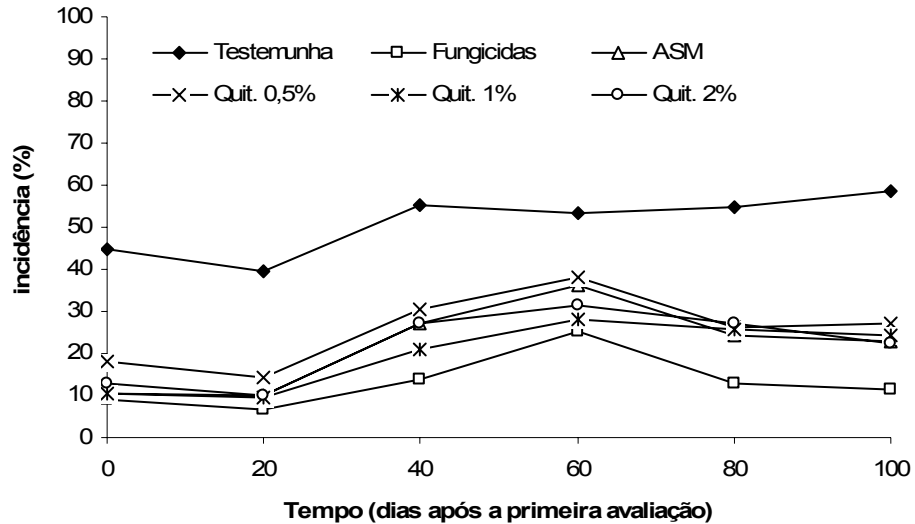


Figura 3.1. Curva de progresso da incidência de mancha-de-micosferela em plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana (Quit) e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004.

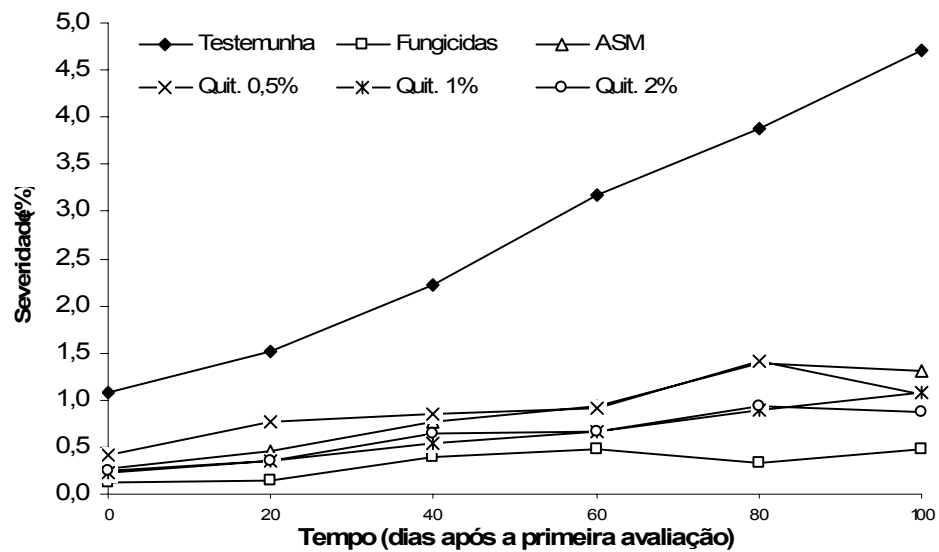


Figura 3.2. Curva de progresso da severidade em % de área foliar lesionada com mancha-de-micosferela em plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana (Quit) e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004.

A incidência de mancha-de-dendrofoma apresentou valores mais elevados no início e final do ciclo da cultura, condição característica para esta doença, a qual geralmente é observada na fase inicial e final do ciclo da cultura, infectando as folhas mais velhas (COSTA & VENTURA, 2006). O efeito dos indutores e fungicidas foi observado sobre a redução dos sintomas, uma vez que da primeira à quarta avaliação todos os tratamentos apresentaram menor incidência da doença, em comparação com a testemunha. Porém nas últimas duas avaliações não ocorreram diferenças entre os tratamentos (Figura 3.3).

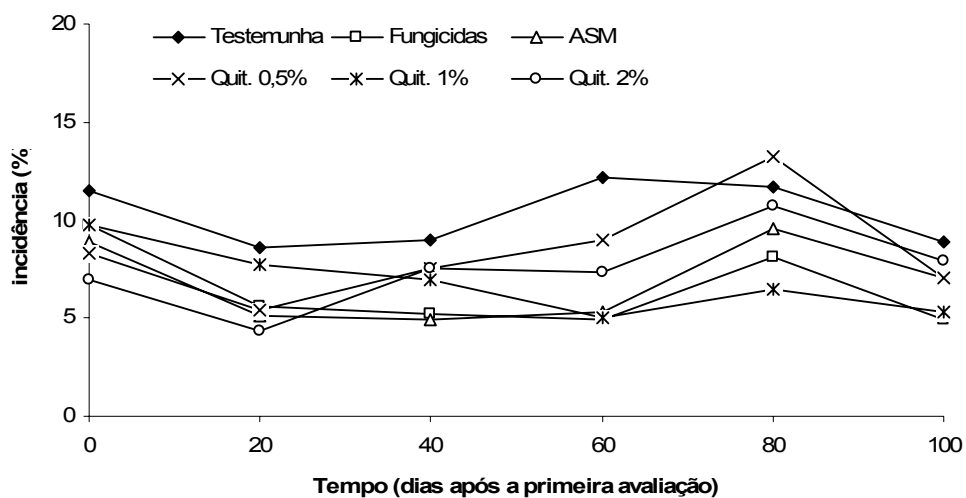


Figura 3.3. Curva de progresso da incidência de mancha-de-dendrofoma em plantas de morangueiro cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana (Quit) e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004.

Foi observado uma resposta significativa das concentrações de quitosana na redução da mancha-de-micosferela e mancha-de-dendrofoma, ficando evidenciado esse efeito nas concentrações de 0,5% e 1,0% (Figuras 3.4A e B e Figura 3.5). Em soja, avaliaram-se concentrações de 0 a 5 mg.mL<sup>-1</sup> quitosana sobre *Fusarium solani* e observou-se efeito de todas as concentrações sobre o crescimento do fungo, porém, nas mais elevadas ocorreram mudanças morfológicas nas hifas (PRAPAGDEE et al., 2007). No presente trabalho a regressão da AACPD, em função das concentrações, indicou uma tendência de quitosana, a partir de 2%, elevar os níveis da doença (Figura 3.4),

possivelmente ao fato do produto, nessa concentração, causar um dano fitotóxico nas plantas tornando-as mais susceptíveis a infecções por patógenos foliares.

Na avaliação de antracnose (flor-preta) nas estruturas da planta (pecíolo foliar, flor e fruto), observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos na segunda avaliação e na média das avaliações, sendo que todos os tratamentos diferiram da testemunha (Tabela 3.2), demonstrando efeito dos indutores na redução da doença, de forma comparável ao tratamento com fungicidas.

O efeito dos indutores quitosana e ASM sobre a redução das doenças, possivelmente esteja relacionado à ativação de rotas do metabolismo secundário para compostos metabólicos relacionados à patogenicidade, como compostos fenólicos, observado nesse trabalho (Tabela 3.3.), bem como a ativação de proteínas relacionadas à patogenicidade, como  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases, observada em análise complementar realizada no experimento de 2005 (Tabela 3.4). A quitosana atua na RSA, induzindo a transcrição e tradução de genes de defesa (AGRAWAL et al., 2002) com ativação e ou síntese de proteínas relacionadas à patogenicidade (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998) e a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006). Entre as proteínas-RPs mais pesquisadas estão as  $\beta$ -1,3-glucanases e as quitinases, que possuem atividade hidrolítica, sobre polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos provocando enfraquecimento das mesmas e morte celular dos fitopatógenos, com atividades aumentadas quando plantas são tratadas com indutores de resistência (LABANCA, 2002).

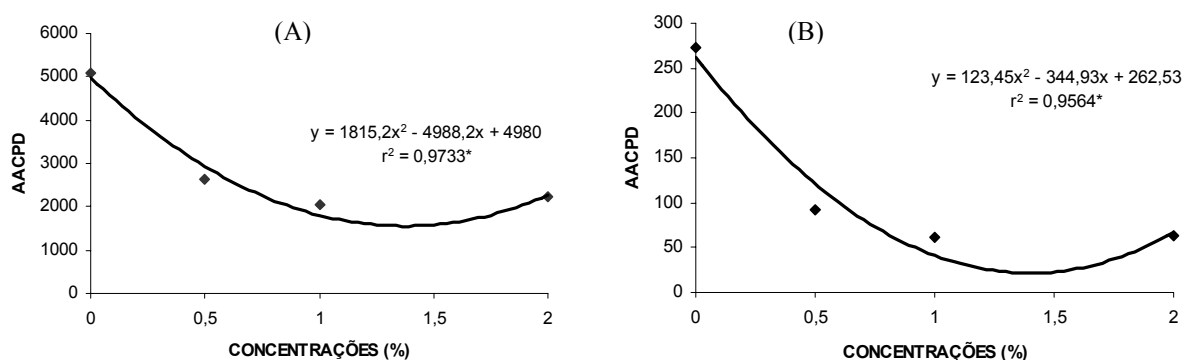


Figura 3.4. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para incidência (A) e severidade (B) de mancha-de-micosferela em plantas de morangueiro cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004. \*Significativo a 5% de probabilidade de erro.

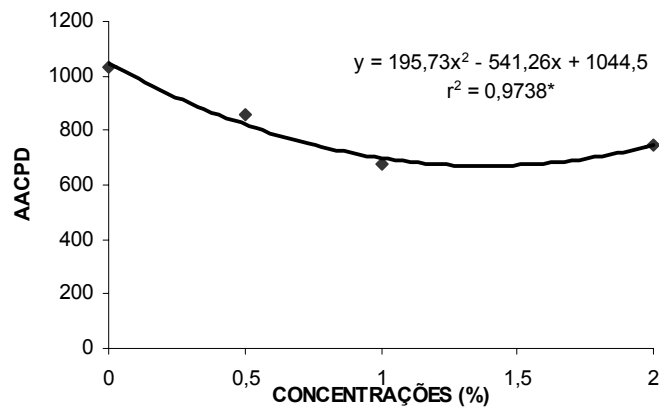


Figura 3.5. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para incidência de mancha-de-dendrofoma em plantas de morangueiro cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004. \*Significativo a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3.2. Incidência de flor-preta nas estruturas da planta (pecíolo foliar, no fruto e na flor) em plantas de morangueiro da cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004.

Tratamentos	Incidência de antracnose nas estruturas da planta (%)		
	01/11	10/12	Média
Testemunha	13,6ns	23,0a	18,3a
Fungicidas	12,0	14,5c	13,2b
ASM	13,3	15,0c	14,1b
Quitosana 0,5%	14,0	17,0b	15,5b
Quitosana 1,0%	13,0	18,0b	15,5b
Quitosana 2,0%	13,4	17,0b	15,2b
CV (%)	26,4	14,9	20,0

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



A associação dos fungicidas utilizados mostrou-se eficiente no controle de mancha-de-micosferela, mancha-de-dendrofoma e flor-preta (Tabela 3.1 e Tabela 3.2). No entanto, nas condições em que foi conduzido o experimento a incidência e severidade de doenças foi baixa, não refletindo em perda de produtividade por redução da área fotossintética. Isso indica, que muitas vezes, o uso indiscriminado de agrotóxicos em morangueiro, não se faz necessário quando as condições de cultivo são adequadas à cultura e desfavoráveis aos patógenos.

Nas avaliações bioquímicas realizadas observaram-se alterações nos teores foliares de aminoácidos, açúcares totais e redutores em todos os tratamentos, com elevação dos seus níveis no decorrer das avaliações (Tabela 3.3). Essas alterações generalizadas, no decorrer do tempo de avaliação, podem estar relacionadas com as condições climáticas que alteraram o metabolismo da cultura. Em relação ao efeito dos tratamentos, ocorreu diferença significativa com o uso dos indutores quitosana e ASM sobre os aminoácidos, açúcares totais e redutores, mantendo os valores das médias das avaliações superiores às plantas da testemunha (Tabela 3.3). A elevação dos teores de aminoácidos, açúcares redutores (glicose, manose e frutose) e açúcares totais (redutores e sacarose) pode estar relacionada ao aumento da atividade metabólica das plantas induzidas, pois os ciclos metabólicos estão integrados e um processo de indução de compostos do metabolismo secundário pode afetar o metabolismo primário do carbono, como a glicólise, pentose fosfato ou ciclo do ácido cítrico. KUHN (2007), trabalhando com ASM em feijoeiro obteve alteração nos níveis de proteína totais e açúcares redutores, sugerindo que a elevação dos níveis de proteínas esteja relacionado à síntese de proteínas-RPs, além de outras proteínas relacionadas à defesa vegetal, e que a elevação dos níveis de açúcares redutores seria uma evidência da inversão no processo de armazenamento, visto que, para a planta manter um nível respiratório mais elevado há necessidade de açúcares simples disponíveis.

Os indutores quitosana e ASM induziram a produção de compostos fenólicos, os quais podem ser observados nas avaliações de fenóis totais (Tabela 3.3), sendo o acúmulo observado após 24 horas e com maior destaque na avaliação realizada com 72 horas após a aplicação dos indutores. ROSSARD et al. (2006), trabalhando com a planta dormideira (*Mimosa pudica*), após a aplicação de quitosana observaram a expressão da enzima fenilalanina amônia-liase e o acúmulo de composto fenólicos. A atividade da PAL foi evidenciada após 6 horas do tratamento e elevada em 207% após 15 horas, sendo os compostos fenólicos, após 24 horas do tratamento, acrescidos em 70% em comparação com os valores iniciais.

Tabela 3.3- Concentração de proteínas (mg.g tecido<sup>-1</sup>), aminoácidos (mg.g tecido<sup>-1</sup>), açúcares totais e redutores (mg.g tecido<sup>-1</sup>) e fenóis totais (mg.g tecido<sup>-1</sup>) presentes nos extratos foliares de plantas de morangueiro da cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2004.

Tratamentos	Avaliações bioquímicas					
	24 horas	72 horas	120 horas	168 horas	Média	CV***
<b>Proteínas totais</b> (mg.g tecido <sup>-1</sup> )						
Testemunha	66,9 ns*	69,8 ns	76,3 ns	72,2 ns	71,3ns	21,4
Fungicidas	72,3	74,7	79,4	71,7	74,5	18,7
ASM	70,4	83,3	77,6	73,9	76,3	14,2
Quitosana 1,0%	68,8	77,3	75,7	72,0	73,4	19,7
C.V.**	7,6	9,2	3,4	7,5	6,9	
<b>Aminoácidos</b> (mg.g tecido <sup>-1</sup> )						
Testemunha	0,155 bB	0,178 cA	0,180 aA	0,187 aA	0,175b	22,4
Fungicidas	0,146 bB	0,211abA	0,205 aA	0,211 aA	0,193a	14,6
ASM	0,146 bC	0,245 aA	0,196 aB	0,178 aB	0,191a	18,7
Quitosana 1,0%	0,180 aB	0,220 abA	0,213 aA	0,195 aB	0,202a	16,8
C.V.**	14,7	10,9	28,9	18,0	18,6	
<b>Açúcares totais</b> (mg.g tecido <sup>-1</sup> )						
Testemunha	1,67 bC	3,67 cB	9,58bB	27,61 aA	10,6b	32,4
Fungicidas	4,57 abC	4,17 bcC	16,69abB	26,91 aA	13,0ab	29,5
ASM	5,07 aC	10,98 bB	13,29abB	24,70 aA	13,5ab	19,7
Quitosana 1,0%	5,78 aC	13,89 abB	19,20 aB	32,62 aA	17,8a	16,8
C.V.**	36,4	34,0	28,08	23,93	27,26	
<b>Açúcares redutores</b> (mg.g tecido <sup>-1</sup> )						
Testemunha	0,024 aB	0,034 cB	0,047 aB	0,081 aA	0,046b	12,4
Fungicidas	0,031 aB	0,042 bB	0,052 aB	0,094 aA	0,054a	11,8
ASM	0,039 aB	0,049 aB	0,055 aB	0,088 aA	0,057a	14,9
Quitosana 1,0%	0,033 aB	0,048 aB	0,051 aB	0,097 aA	0,057a	9,7
C.V.**	22,2	6,2	15,3	11,9	13,1	
<b>Fenóis totais</b> (mg.g tecido <sup>-1</sup> )						
Testemunha	3,0 bA	3,3 bA	3,2 aA	2,7 aA	3,05b	9,4
Fungicidas	3,4 abB	4,4 aA	3,7 aB	2,8 aC	3,57a	6,9
ASM	3,6 aB	4,5 aA	3,3 aBC	2,9 aC	3,57a	11,4
Quitosana 1,0%	3,5 aB	4,4 aA	3,3 aBC	2,8 aC	3,50a	9,7
C.V.**	6,4	7,5	10,7	13,7	10,1	

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Coeficiente de variação dos tratamentos.

\*\*\* Coeficiente de variação das datas de coleta.

A atividade das peroxidases foram estimuladas pelo uso dos indutores, apresentando expressão após 120 horas da aplicação com quitosana e após 168 horas com ASM em comparação com os valores obtidos após 24 horas da aplicação dos indutores (Tabela 3.4). As peroxidases não têm relação direta com a indução de resistência, no entanto, a alteração de sua atividade é um indício de alteração do metabolismo da planta, como na formação da lignina pela polimerização de fenóis (LABANCA, 2002). Após as 120 horas da aplicação dos indutores a atividade dessa enzima tornou-se mais expressiva na testemunha, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 3.4). Isso possivelmente se deve ao fato das plantas desse tratamento terem sido atacadas por patógenos, e ocorreu a ativação das peroxidases para atuarem sobre as espécies reativas de oxigênio e livrar a célula de seu efeito deletério.

Avaliando conjuntamente o incremento na atividade da peroxidase e dos níveis de fenóis totais pelo uso dos indutores (Tabela 3.3 e Tabela 3.4), pode-se dizer que possivelmente quitosana e ASM ativaram a rota dos fenilpropanóides, ou seja, mecanismos que envolvem a síntese de lignina e compostos fenólicos foram potencializados.

Os indutores quitosana e ASM ativaram as proteínas-RPs, sendo as  $\beta$ -1,3-glucanases pronunciada nas primeiras 120 horas após a aplicação de quitosana, com sua atividade acrescida em 680%, 294% e 370% nas avaliações de 24, 72 e 120 horas, respectivamente, em comparação com a testemunha. Para o ASM a atividade das  $\beta$ -1,3-glucanases foram mais expressiva com 120 horas, em comparação com os valores obtidos após 24 horas da aplicação dos indutores (Tabela 3.4). A atividade das quitinases foram pronunciada a partir de 168 horas da indução, sendo seus valores acrescidos em 340% e 230%, para quitosana e ASM, respectivamente, em comparação com os valores obtidos após 24 horas da aplicação dos indutores (Tabela 3.4). Entre as proteínas-RPs mais pesquisadas estão as  $\beta$ -1,3-glucanases e as quitinases, com atividade antimicrobiana hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos, sendo expressadas na RSA, associadas à cascata de sinais do ácido salicílico, o qual é o sinalizador para a expressão dessas proteínas relacionadas à patogenicidade (GLAZEBROOK, 2005). A utilização de quitosana em citros para o controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citrus, induziu o aumento das atividades das enzimas quitinases, glucanases, peroxidases e polifenoloxidasas, sendo detectada sua maior atividade nas primeiras 24 horas após a indução (RAPPUSSI-DA-SILVA, 2006). Em plantas de feijão tratadas com ASM ocorreu aumento da atividade das peroxidases, das quitinases e das  $\beta$ -1,3-glucanases, sendo que a atividade das quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases aumentaram quando receberam o indutor, porém, decorridos 14 dias o nível de atividade retornava a valores próximos ao controle (KUHN, 2007).

Tabela 3.4- Atividade enzimática de peroxidases (unidade enzimática.minuto<sup>-1</sup>), quitinases (UAbs.min<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup>) e β-1,3 glucanases (UAbs.min<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup>) presentes nos extratos foliares de plantas de morangueiro da cultivar Aromas não tratadas e em plantas tratadas com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. Dois Vizinhos, PR, 2005.

Tratamentos	Avaliações bioquímicas enzimáticas					
	24 horas	72 horas	120 horas	168 horas	Média	CV***
<b>Atividade de peroxidases</b> (unidade enzimática.minuto <sup>-1</sup> )						
Testemunha	101,0 aB	102,9 aB	148,8 aA	142,8 aA	123,87a	12,5
Fungicidas	100,2 aA	104,9 aA	111,7 bA	102,3 bA	104,77b	11,5
ASM	89,5 aB	104,6 aB	98,7 bB	120,0 bA	103,20b	7,7
Quitosana 1,0%	86,4 aB	81,2 aB	103,4 bA	107,6 bA	94,65b	12,7
C.V.**	15,6	11,86	6,33	14,65	12,08	
<b>Atividade de quitinases</b> (UAbs.min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> )						
Testemunha	11,0.10 <sup>-4</sup> aA	8,9.10 <sup>-4</sup> aA	6,4.10 <sup>-4</sup> aA	7,6.10 <sup>-4</sup> cA	8,4.10 <sup>-4</sup> b	14,6
Fungicidas	14,0.10 <sup>-4</sup> aA	6,6.10 <sup>-4</sup> aA	6,6.10 <sup>-4</sup> aA	6,1.10 <sup>-4</sup> cA	8,3.10 <sup>-4</sup> b	12,6
ASM	14,0.10 <sup>-4</sup> aB	8,7.10 <sup>-4</sup> aB	6,7.10 <sup>-4</sup> aB	33,0.10 <sup>-4</sup> bA	15,6.10 <sup>-4</sup> a	11,4
Quitosana 1,0%	12,0.10 <sup>-4</sup> aB	7,7.10 <sup>-4</sup> aB	7,2.10 <sup>-4</sup> aB	41,0.10 <sup>-4</sup> aA	16,9.10 <sup>-4</sup> a	10,6
C.V.**	26,94	30,89	55,65	21,55	32,26	
<b>Atividade de B-1,3 Glucanases</b> (UAbs.min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> )						
Testemunha	2,8.10 <sup>-4</sup> cC	7,5.10 <sup>-4</sup> bB	6,9.10 <sup>-4</sup> bB	14,0.10 <sup>-4</sup> aA	7,8.10 <sup>-4</sup> c	21,1
Fungicidas	3,4.10 <sup>-4</sup> cC	4,6.10 <sup>-4</sup> bC	27,0.10 <sup>-4</sup> aA	12,0.10 <sup>-4</sup> aB	11,7.10 <sup>-4</sup> b	26,3
ASM	10,2.10 <sup>-4</sup> bB	14,5.10 <sup>-4</sup> aB	25,0.10 <sup>-4</sup> aA	13,0.10 <sup>-4</sup> aB	15,6.10 <sup>-4</sup> ab	28,6
Quitosana 1,0%	19,1.10 <sup>-4</sup> aA	22,1.10 <sup>-4</sup> aA	25,9.10 <sup>-4</sup> aA	14,0.10 <sup>-4</sup> aB	20,2.10 <sup>-4</sup> a	9,0
C.V.**	15,48	14,50	12,64	19,82	15,12	

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Coeficiente de variação dos tratamentos.

\*\*\* Coeficiente de variação das datas de coleta.

O tratamento com fungicidas induziu a formação de compostos metabólicos como acúmulo de fenóis totais, comparável ao tratamento com os indutores (Tabela 3.3), bem como a formação de proteínas-RPs (β-1,3-glucanases), na avaliação de 120 horas após a aplicação dos tratamentos (Tabela 3.4). Isso possivelmente esteja relacionado ao fato dos

fungicidas empregados possuem além de atividade antifúngica, algum efeito de indução de resistência. Esse efeito indutor de fungicidas já foi observado em trabalho desenvolvido por ANTONIAZZI (2005), o qual obteve alterações na proteínas-RPs ( $\beta$ -1,3-glucanase) com o uso dos fungicidas epoxiconazole + pyraclostrobin no tratamento de cevada.

### 3.4. CONCLUSÕES:

Quitosana e ASM atuaram na redução da mancha-de-micosferela, mancha-de-dendrofoma e flor-preta em morangueiro;

Os indutores quitosana e ASM interferiram nos parâmetros bioquímicos foliares;

Os indutores quitosana e ASM atuaram na resistência sistêmica adquirida em morangueiro, ativando as proteínas-RPs.

### REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; TAMOGAMI, S.; YONEKURA, M.; KUBO, A. SAJI, H. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, p.1061-1069, 2002.

ALTHAUS, R.A.; CANTERI, M.G.; GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. **Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica**, Parte 1, Ponta Grossa, p.280-281, 2001.

ANTONIAZZI, N. **Desenvolvimento de cevada em resposta ao uso de elicitores para controle de *Bipolaris sorokiniana***. Curitiba, 2005, 63p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; VALLE, M.G.V.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BARKA, E.A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON C.L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, Oxford, v.25, p.108-118, 2006.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radici-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.1203-1212, 1998.

BESSER, K.; JAROSH, B.; LANGEN, G.; KOGEL, K.H. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Molecular Plant Pathology**, London, v.1, p.277-286, 2000.

BHASKARA-REDDY, B.M.V.; AIT BARKA, E.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Science Technology**, Nova York, v. 8, p.33-43, 1998.

BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extratcts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.17, p.278-293, 1966.

BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil, In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2003, p.13-51.

CARISSE, O.; BOURGEOIS, G.; DUTHIE, J.A. Influence of temperature and leaf wetness duration on infection of strawberry leaves by *Mycosphaerella fragariae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.10, 1120-1125, 2000.

COSTA, H.; VENTURA, J.A. **Manejo Integrado de Doenças do Morangueiro**. In: III ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2006, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 167, 2006, v.1. p.17-28.

COSTA, H.; ZAMBONI, L.; VENTURA, J.A. Manejo Integrado das Doenças do Morangueiro, In: ZAMBONI, L. (Ed.), **Produção Integrada Fruteiras Tropicais**, Viçosa: UFV, 2003, p.131-164.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.703-714, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.28, p.350-356, 1956.

DURRANT, W.E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, p.185-209, 2004.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, p.398-402, 1992.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.205-227, 2005.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.

HEIL, M.; BOSTOCK, M.R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, London, v.89, p.503-512, 2002.

INBAR, M.; DOOSTDAR, H.; SONODA, R.M.; LEIBEE, G.L.; MAYER, R.T. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.24, p.135-149, 1998.

JENNINGS, A.C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.118, p.396-398, 1991.

KUHN, 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**. Piracicaba, 2007, 140p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

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*).**

Piracicaba, 2002, 107p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.58, p.199-208, 2001.

MATHUR, N. K.; NARANG, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, Easton, v.67, p.938-942, 1990.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v.23, p.1091-1101, 1972.

MAZARO, S.M.; GOUVEA, A.; MAY-DE-MIO, L.L.; DECHAMPS, C.; BIASI, L.A.; CITADIN, I. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-de-micosferela em morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.648-652, 2006.

PRAPAGDEE, B.; KOTCHADAT, K.; KUMSOPA, A.; VISARATHANONTH, N. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. **Bioresource Technology**, Essex, v.98, n.7, p.1353-1358, 2007.

RAPPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita**. Piracicaba, 2006, 82p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

REDDY, M.V.B.; BELKACEMI, K; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.20, p.39-51, 2000.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; VENERE, D.I.; SALERNO, M. Effects of Pre- and postharvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v.67, p.1862-1867, 2002.



ROSSARD, S.; LUINI, E.; PÉRAULT, J.M.; BONMORT, J.; ROBLIN, G. Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, n.6, p.1245-1252, 2006.

SATHIYABAMA, M.; BALASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection**, Oxford, v.17, p.307-313, 1998.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3<sup>o</sup> ed., Nova York: McGraw-Hill, 1997, 666p.

TANAKA M.A.S.; PASSOS, F.A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 484-488, 2002.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technoloy**, Amsterdam, v.32, p.1-13. 2004.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Micro-plate colorimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, Mandan, v. 24, 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 Tecnology**, Amsterdam, v.12, 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**, Ashford, v.73, p.763-767, 1998.

ZONTA, E.P.; MACHADO A.A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores – SANEST**. Pelotas:UFPel, Instituto de Física e Matemática, 1984, 150p.

#### 4- CAPÍTULO III – COMPORTAMENTO PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE MORANGUEIRO APÓS A APLICAÇÃO DE QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METIL DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA CULTURA.

**RESUMO:** O uso de indutores de resistência em plantas é um método alternativo e promissor no controle de podridões pós-colheita de frutos. Assim sendo, foi conduzido um experimento na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos – PR, no ano de 2004, com objetivo de avaliar a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar - S-metil (ASM) sobre o comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro da cultivar Aromas. O delineamento experimental no campo foi de blocos ao acaso com quatro repetições, contendo 16 plantas por parcela de onde foram retirados os frutos para as análises pós-colheita. Os tratamentos compararam o efeito da aplicação de quitosana (0,5, 1,0 e 2,0 %), e ASM na concentração de 0,0025%, à testemunha (água destilada). O tratamento controle seguiu um cronograma de aplicação de fungicidas convencionais, sendo utilizado tiofanato-metílico (0,0049%), iprodione (0,0075%) e folpete (0,00135%). A frequência de aplicações dos produtos foi a cada sete dias, totalizando 20 aplicações. Para as análises físico-químicas em pós-colheita determinou-se a incidência de podridões e danos, firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais e perda de massa. As análises fisiológicas e bioquímicas dos frutos incluíram a taxa respiratória, produção de etileno, concentração de açúcares redutores, polifenóis e antocianinas. A aplicação pré-colheita de quitosana, nas três concentrações avaliadas, retardou a maturação dos frutos, mantendo maior firmeza de polpa e acidez titulável, além de diminuir a perda de massa. Também diminuiu a produção de etileno, o teor de açúcares redutores e manteve mais elevado os teores de polifenóis totais. Quitosana nas três concentrações avaliadas induziu maior resistência das plantas aos patógenos, resultando na diminuição das podridões de frutos em pós-colheita. No entanto, a concentração de 2% de quitosana causou dano aos frutos na pós-colheita elevando a taxa respiratória e o teor de açúcares redutores. O ASM teve efeito na retenção da acidez titulável e na redução de podridões, similar ao tratamento com fungicidas. A aplicação de quitosana e ASM na pré-colheita não interferiu na qualidade organoléptica dos frutos em pós-colheita.

**Palavras-chaves:** elicitor, ASM, morango, qualidade, *Botrytis cinerea*.

## POSTHARVEST BEHAVIOR OF STRAWBERRY FRUITS AFTER TREATMENT WITH CHITOSAN AND ACIBENZOLAR-S-METHYL DURING THE DEVELOPMENT OF THE CULTURE.

**ABSTRACT:** The use of inductors of resistance in plants represents an alternative and promising method to control fruit rots in the postharvest. The experiment was carried out at Federal Technological University of the Parana - Dois Vizinhos - Campus - PR, in 2004 with the objective of evaluating the induction of chitosan resistance and acibenzolar-S-methyl (ASM) in strawberry plants. The experimental design was in randomized block with four replications, each one containing 16 plants. The treatments compared the effect of chitosan (0,5; 1,0 and 2.0%) and ASM (0,00025%) in relation to control plants (distilled water only) and those with fungicides application tiofanato-metilico (0,0049%); iprodione (0,0075%) and folpete (0,00135%). The treatments were applied each seven days, totalizing 20 applications by the end of the experiment. The physico-chemical analysis included the rots incidence and damages, flesh firmness, titratable acidity, total soluble solids and mass loss. The physiological and biochemical analyses were performed in the fruits including respiration rate, ethylene production, reducing sugar, polyphenol and anthocyanin concentrations. The chitosan treatment in all evaluated concentrations, delayed the fruit maturation, increased the flesh firmness and titratable acidity and decreased the mass loss. It was also observed ethylene production and the reducing sugars reduction and total polyphenol increase in strawberry fruits. The chitosan treatment in all evaluated concentrations induced greater plant resistance to diseases with effect on the reduction of the fruit rots in the postharvest by *Botrytis cinerea*. Although, chitosan treatment in the concentration of 2% caused damage to the fruits in the postharvest increased the respiration rate and the sugar reduction. The ASM had effect on the retention of the titratable acidity and acted efficiently on the rot reduction similar to the treatment with fungicides. The application of chitosan and ASM did not intervene in the organoleptic quality of the fruits in the postharvest.

**Key words:** elicitor, ASM, strawberry, quality, *Botrytis cinerea*.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O morango é um fruto de alta perecibilidade pós-colheita, característica natural da espécie, porém agravada por podridões, principalmente causados por *Botrytis cinerea* Pers., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) e *Penicillium digitatum* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003). Essas perdas podem ser reduzidas minimizando os danos mecânicos e mantendo as frutas em condições adequadas de armazenamento na pós-colheita, com baixa temperatura, alta concentração de CO<sub>2</sub> e atmosfera controlada (EL GHAOUTH et al., 1992). Altas concentrações de CO<sub>2</sub> são eficientes no retardo da maturação, mas podem causar danos aos frutos e perda de sabor quando excedem o limite tolerável (LI & KADER, 1989). Além disso o uso de atmosfera controlada não é uma tecnologia acessível ao pequeno produtor. A aplicação de fungicidas em pré-colheita mostra-se como um método eficiente na redução de podridões na pós-colheita. No entanto, o controle químico possui limitações, pois seu uso excessivo pode gerar resíduos nos frutos e surgimento de resistência dos patógenos aos ingredientes ativos. Além disso, a falta de registros de fungicidas mais eficientes para a cultura pode comprometer seu desempenho (PAULUS, 1990).

O uso de compostos naturais ou biodegradáveis, não tóxicos, derivados de animais ou plantas, que apresentem efeito fungistático ou induzam a resistência natural das plantas, tem tomado destaque entre os fitopatologistas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006). Entre eles há a quitosana, que é um polissacarídeo obtido da desacetilização da quitina, presente em invertebrados marinhos, insetos, fungos e leveduras (MATHUR & NARANG, 1990), sendo citada como um produto com efeito fungistático e indutor dos mecanismos de defesa das plantas (TERRY & JOYCE, 2004). Este produto, quando aplicado em frutos de morango demonstra eficiência no controle de *B. cinerea* e *R. stolonifer* (EL GHAOUTH et al., 1992). A aplicação de quitosana em pré-colheita além de controlar *B. cinera* em pós-colheita, mantém a firmeza de polpa, acidez titulável e diminui a síntese de antocianinas e seu uso em pós-colheita pode ser tão eficiente quanto o uso de fungicidas, induzindo enzimas de defesa, síntese de fitoalexinas e inibindo o crescimento do fungo (REDDY et al., 2000). A ação da quitosana está relacionada ao aumento da concentração endógena de ácido salicílico (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998), compostos fenólicos, indução de lignificação e síntese de fitoalexinas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006), ativação das enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (ZHANG & QUANTICK, 1998), fenilalanina amônia-liase (PAL) (ROMANAZZI et al., 2002) e peroxidase (ZHANG & QUANTICK, 1997). Atua ainda na inibição de enzimas de desestruturação da parede celular sintetizadas por fungos como a poligalacturonase, pectinaliase e celulase, e nos compostos tais como ácidos orgânicos

oxálico e fumárico, e toxinas específicas, como alternariol (BHASKARA-REDDY et al., 1998).

O acibenzolar (ASM) é um elicitador sintético, com atuação na resistência sistêmica adquirida (STICHER et al., 1997), de forma análoga ao ácido salicílico (VALLAD & GOODMAN, 2004), acumula proteínas relacionadas à patogenicidade, fitoalexinas e PAL (KATZ et al., 1998). Em morangos, a aplicação pré-colheita de ASM diminui a podridão pós-colheita causada por *B. cinerea* (TERRY & JOYCE, 2000).

Sendo assim, este trabalho, objetivou avaliar a aplicação pré-colheita de quitosana e ASM sobre o comportamento físico-químico, fisiológico e bioquímico em pós-colheita de frutos de morangueiro da cultivar Aromas.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. Experimento em campo**

O experimento foi conduzido no ano de 2004 com a cultivar de morango Aromas. O plantio foi realizado no mês de maio, no espaçamento de 30x30cm com quatro fileiras por canteiro. O sistema de condução foi em túnel baixo, com fertirrigação, com duas fileiras de tubos gotejadores e com sistema de mulching plástico. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com seis tratamentos em quatro repetições com 16 plantas por parcela. Os tratamentos incluíram 20 aplicações realizadas em intervalos de sete dias, sendo: quitosana nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0% e ASM na concentração de 0,0025% diluído em água destilada; fungicidas recomendados para a cultura: tiofanato-metílico (0,0049%), iprodione (0,0075%) e folpete (0,00135%) e a testemunha sendo aplicação de água destilada. A seqüência de aplicação de fungicidas foi: primeiramente aplicação de tiofanato-metílico e nas semanas subseqüentes foi alternado o uso de iprodione e folpete. Não houve continuidade com o uso do tiofanato-metílico, no decorrer do experimento, devido o período de carência do referido produto ser de 14 dias e as colheitas serem feitas em intervalo médio de três dias.

A quitosana foi adquirida do Laboratório Farma, com grau de desacetilização acima de 94% e densidade aparente de 0,71g/mL. Para dissolver o produto, utilizou-se ácido acético a 1% e após completa diluição acrescentou-se água destilada para obter as concentrações finais.

Os morangos foram colhidos e levados ao laboratório da UTFPR – Dois Vizinhos, para contagem, pesagem e seleção. Em seguida foram acondicionados em bandejas

plásticas, compostas por 25 frutos cada, e mantidos na temperatura média de 25°C, para as avaliações físico-químicas pós-colheita. As análises de firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais e perda de massa fresca, foram realizadas durante 4 dias, sendo avaliadas diariamente.

#### **4.2.2. Análises físico-químicas e avaliações de doenças**

As análises físico-químicas de firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais, perda de massa fresca e podridões foram desenvolvidas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Dois Vizinhos – PR.

A firmeza de polpa foi determinada com uso de penetrômetro manual de alta precisão com leitura de 0 a 14 libras, munido de uma ponteira de 7,9 mm, perfurando-se cada fruta em dois lados opostos na região equatorial. O valor foi expresso em libras/cm<sup>2</sup> e transformado para Newton.

A acidez titulável foi determinada em uma amostra de 10 mL de suco dos frutos, extraído com auxílio de um multiprocessador eletrônico, sendo essa amostra diluída em 100 mL de água destilada e titulada com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1N até pH 8,1. O resultado foi expresso em meq.100mL<sup>-1</sup>.

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado por refratometria manual, com posterior correção do efeito da temperatura e o resultado expresso em °Brix.

A perda de massa fresca foi obtida pela diferença de massa nas amostras do dia da instalação do experimento e do valor encontrado nas pesagens realizadas diariamente.

Para a avaliação de danos aos frutos foi considerada a presença e a ausência, considerando fruto danificado aquele que apresentava características anormais de coloração.

A avaliação da incidência de podridões foi realizada pela análise visual e expressa em percentual de frutas, sendo consideradas frutas podres aquelas que apresentavam sintomas típicos (micélio aparente) de ataque de patógenos, sendo os patógenos identificados com o uso de lupas de mesa. Para melhor avaliação dos tratamentos, com relação às podridões, foram realizadas avaliações no início e no final do ciclo da cultura, sem e com inoculação de *Botrytis cinerea* em campo e em pós-colheita, conforme exposto no Quadro 4.1. A inoculação consistiu na pulverização da suspensão de conídios na concentração de 10<sup>5</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> sobre as plantas e ou frutos. O inóculo foi preparado a partir de isolados de *Botrytis cinerea* obtidos de frutos do experimento em campo. As

culturas puras foram desenvolvidas em placas de Petri, de 11 cm de diâmetro, contendo meio de BDA (batata 200 g, dextrose 20 g, ágar 20 g e água destilada 1.000 mL), mantidas em estufa incubadora tipo BOD a 23°C e fotoperíodo de 12 horas. Nessas placas foram adicionados 10 mL de água destilada e então procedeu-se a raspagem da superfície das colônias com uma lâmina de microscopia esterilizada. Em seguida, a suspensão de inóculo obtida foi filtrada, determinando-se a concentração de esporos com a câmara de Neubauer.

#### **4.2.3. Análises fisiológicas, bioquímicas e sensoriais**

As avaliações fisiológicas e bioquímicas dos frutos de uma colheita foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita da UFSM - Santa Maria - RS, sendo iniciadas aproximadamente 12 h após a colheita.

Na análise da síntese de etileno, amostras contendo 25 frutos foram acondicionadas em recipientes de vidro de 5 L, hermeticamente fechados durante duas horas a 20°C. Após esse período, com uma seringa de plástico de 1 mL, foram coletadas duas amostras da atmosfera interior desses recipientes e imediatamente injetadas em cromatógrafo a gás, marca Varian®, modelo 3400, equipado com uma coluna de aço inox 1/8" de 0,70 m de comprimento, preparada com Porapak N80/100 e um detector de ionização de chama, com N<sub>2</sub> como gás de arraste. As temperaturas da câmara de injeção, coluna e detector foram: 90°C, 140°C e 200°C, respectivamente. O cromatógrafo foi acoplado a um microcomputador com software da Varian®, específico para curva de calibração, que forneceu os resultados em mL L<sup>-1</sup>. Por meio da concentração de etileno, da massa dos frutos, do volume do espaço livre no recipiente e do tempo, foi calculada a produção de etileno em mL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

A respiração foi determinada pela produção de CO<sub>2</sub> nos frutos. O ar do recipiente utilizado para determinação da síntese de etileno foi circulado através de um analisador eletrônico de CO<sub>2</sub>, marca Agri-Datalog®, e por meio da concentração de CO<sub>2</sub>, do volume do espaço livre, da massa dos frutos e do tempo de fechamento, foi calculada a respiração em mLCO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método titulométrico de LANE & EYNON, (1934), adaptado para análises de sucos de morangos, partindo de 5ml de suco. O valor foi expresso em grama de açúcar redutor.100mL<sup>-1</sup> (AOAC,1970).

A determinação de polifenóis totais foi realizada pelo método colorimétrico descrito por SINGLETON & ROSSI (1965). Em balão volumétrico de 20mL adicionaram-se 2mL de amostra diluída (1:10), 10 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10) e 8 mL de NaCO<sub>3</sub> a 7,5%. Após duas horas leu-se a absorbância a 765nm, em espectrofotômetro marca Femto. Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de ácido gálico. O teor de polifenóis totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico em mg.L<sup>-1</sup>.

A determinação de antocianinas totais foi realizada pela leitura da absorbância em 540nm, conforme descrito por DI STEFANO et al. (1989). As amostras de suco foram diluídas em solução extratora de etanol, ácido clorídrico e água, na proporção de 70:1:30 (V/V/V). O resultado foi aplicado à lei de Beer-Lambert ( $A = e.c.l$ ), onde A = absorbância, e = coeficiente de extinção molar da malvidina (18,8), c = concentração da substância e l = comprimento do passo óptico. Os resultados foram expressos em  $\text{mg.L}^{-1}$  de cloreto de malvidina a partir da curva de calibração.

A avaliação sensorial foi realizada por um grupo de 10 degustadores não treinados, adotando-se dois níveis de qualidade. Nível 1 com sabor, aroma ou textura anormal e nível 2 com sabor, aroma e textura normais.

#### 4.2.4. Demonstrativo cronológico do experimento

Quadro 4.1. Demonstrativo cronológico do plantio das mudas, início da aplicação dos tratamentos e os momentos das avaliações pós-colheita dos frutos. UTFPR, Dois Vizinhos, 2004.

<b>Datas</b>	<b>Procedimentos</b>
21 maio	Plantio das mudas
03 julho	Início da aplicação dos tratamentos
31 julho	1º Avaliação de podridões em pós-colheita de frutos sem a inoculação em campo;
07 agosto	Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos frutos (perda de massa, sólidos solúveis totais, firmeza de polpa e acidez titulável) e sensorial;
17 agosto	Avaliação dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos dos frutos (antocianinas, açúcares redutores, fenóis totais, etileno e respiração);
22 agosto	2º Avaliação de podridões em pós-colheita de frutos com inoculação em campo e sem inoculação em pós-colheita no início do ciclo produtivo da planta;
01 novembro	3º Avaliação de podridões em pós-colheita de frutos com inoculação em campo e sem inoculação em pós-colheita no final do ciclo produtivo da planta;
09 novembro	4º Avaliação de podridões em pós-colheita de frutos com inoculação em campo e com inoculação em pós-colheita no final do ciclo produtivo da planta.



#### 4.2.5. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à avaliação de homogeneidade pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade de erro (STEEL et al., 1997). À análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o software SASM Agri (ALTHAUS et al., 2001). As análises de regressões foram feitas pelo programa de análise estatística SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de quitosana, nas três concentrações avaliadas, manteve mais elevado a firmeza de polpa dos frutos quando comparado com a testemunha (Tabela 4.1). O efeito de quitosana sobre a retenção de firmeza de polpa em morangos também foi observado por REDDY et al. (2000), sendo que a manutenção da firmeza foi relacionada com o incremento nas concentrações de quitosana. A perda de firmeza é dependente da degradação da parede celular e turgidez dos tecidos. Durante a maturação ocorre um incremento de enzimas, principalmente a poligalacturonase, a pectinase e a celulase, degradando os principais constituintes da parede celular, como a transformação de protopectinas em pectinas solúveis. Outro motivo, porém, em menor escala, é a perda de turgidez da célula, ocasionada pela perda de água pelos processos de transpiração e respiração celular. O uso de quitosana, nesse experimento, possivelmente tenha inibido a atividade de enzimas de desestruturação da parede, mantendo os frutos com maior firmeza de polpa, conforme descrito por BHASKARA-REDDY et al., (1998).

Quitosana e ASM atuaram na retenção da acidez titulável quando comparado com a testemunha (Tabela 4.1). A manutenção da acidez titulável em frutos de morango tratados com quitosana também foi observada por HAN et al. (2004), sendo um parâmetro importante na retenção da maturação dos frutos e preservação da sua qualidade. Assim como os açúcares, os ácidos orgânicos são importantes componentes do sabor e aroma e a relação açúcares/acidez é frequentemente utilizada como um índice de qualidade e de aceitabilidade, pelo consumidor, para frutas (MORAES, 2005). A perda da acidez está relacionada ao processo natural de maturação dos frutos, pois ocorre uma utilização dos ácidos orgânicos, principalmente cítrico e málico em morangos, como substrato no processo respiratório via ciclo de Krebs.

Os teores de sólidos solúveis totais (SST) não sofreram alteração em função dos tratamentos com quitosna e ASM e mantiveram-se dentro da normalidade na vida pós-colheita dos morangos (Tabela 4.2). BRACKMANN et al. (2001), avaliando condições de armazenamento em morangos cultivar Oso Grande, também observaram alterações na firmeza de polpa e acidez titulável em função dos tratamentos, mas os teores de SST, não sofreram modificações com o tempo de armazenamento e em função dos tratamentos. Outros autores também não obtiveram diferenças significativas nos níveis de sólidos solúveis totais em função dos tratamentos, como WRIGHT & KADER (1997), que trabalharam com morangos, cv. Selva, processados minimamente e armazenados em diferentes condições de atmosfera controlada, e GIL et al. (1997) avaliando altas concentrações de CO<sub>2</sub> na conservação dos frutos.

A perda de massa fresca também foi menor com o uso de quitosana (Tabela 4.2), após o terceiro dia de avaliação, nas três concentrações avaliadas, sendo que a perda de massa fresca não chegou a 2%, enquanto que na testemunha ficou acima de 3%. Esses dados vêm comprovar o efeito de quitosana sobre a redução de perda de massa observados em morangos (HAN et al., 2004), longan (JIANG & LI, 2001) e lichia (ZHANG & QUANTICK, 1997). A perda de massa fresca é causada principalmente pela perda de água do fruto através dos processos de transpiração e respiração. O morango, devido à sua epiderme fina e ao seu alto teor de umidade, em torno de 90-95%, tem alta susceptibilidade à perda de água, em função da transpiração frente às baixas umidades relativas do ar e às altas temperaturas, resultando em desidratação do fruto. A percentagem máxima de perda de água, antes do morango se tornar inaceitável comercialmente, é de 6% de sua massa na colheita (MORAES, 2005). O efeito de quitosana na redução da perda de massa fresca possivelmente está relacionado à diminuição da atividade metabólica dos frutos como inibição de enzimas dos ciclos metabólicos como observado por BHASKARA-REDDY et al. (1998) e pela sua propriedade “filmogênica” formando uma camada protetora, reduzindo a perda de água, alterando a atmosfera interna e reduzindo a maturação dos frutos (EL GHAOUTH et al., 1992; EL GHAOUTH et al., 1997).

Tabela 4.1. Comportamento da firmeza de polpa ( $\text{N/cm}^2$ ) e acidez titulável ( $\text{meq.100mL}^{-1}$ ) de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004.

Tratamentos	Dias após a colheita			
	colheita	1º dia	2º dias	3º dias
<b>Firmeza de polpa (<math>\text{N/cm}^2</math>)</b>				
Testemunha	22,4b	21,7b	20,7b	20,0b
Fungicidas	21,5b	20,4b	20,1b	19,5b
ASM	22,5b	22b	22ab	21,0ab
Quitosana 0,5%	26,0a	24,5a	23,5a	22,4a
Quitosana 1,0%	25,6a	24,0a	23,3a	22,5a
Quitosana 2,0%	25,1a	24,3a	24,0a	22,6a
C.V. (%)	11,4	9,2	8,7	13,1
<b>Acidez titulável (<math>\text{meq.100mL}^{-1}</math>)</b>				
Testemunha	12,8b	12,5b	12,4b	12,4b
Fungicidas	12,9b	12,8b	12,8a	12,6ab
ASM	13,5a	13,5a	12,8a	12,7a
Quitosana 0,5%	13,6a	13,2a	12,8a	12,8a
Quitosana 1,0%	13,7a	13,5a	13,0a	12,8a
Quitosana 2,0%	13,5a	13,4a	12,9a	12,9a
C.V. (%)	7,3	8,9	9,4	6,5

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4.2. Comportamento de sólidos solúveis totais (°Brix) e perda de massa (%) de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004.

Tratamentos	Dias após a colheita			
	colheita	1º dia	2º dias	3º dias
<b>Sólidos Solúveis Totais (°Brix)</b>				
Testemunha	6,7ns	6,5ns	6,5ns	5,9ns
Fungicidas	6,6	6,4	6,4	6,1
ASM	6,4	6,4	6,3	6,0
Quitosana 0,5%	6,5	6,8	6,9	6,0
Quitosana 1,0%	6,0	6,2	6,6	5,8
Quitosana 2,0%	6,2	6,2	7,0	5,8
C.V. (%)	14,1	14,7	16,4	16,2
<b>Perda de massa (%)</b>				
Testemunha	-	1,0ns	1,9ns	3,1a
Fungicidas	-	1,2	2,1	3,1a
ASM	-	1,1	2,0	2,9a
Quitosana 0,5%	-	0,7	1,3	1,8b
Quitosana 1,0%	-	0,6	1,2	1,6b
Quitosana 2,0%	-	0,5	1,2	1,7b
C.V. (%)	-	6,2	5,4	6,1

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O uso de quitosana, nas três concentrações avaliadas (0,5, 1 e 2%), e nas quatro situações de avaliação (sem e com inoculação com *B. cinera* e no início e final do ciclo produtivo), induziu a planta à maior resistência à patógenos apresentando efeito na diminuição das podridões de frutos em pós-colheita em relação à testemunha (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Podridões em pós-colheita de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004.

Tratamentos	% podridões fúngicas			
	Sem inoculação em campo**	Com inoculação em campo		
		Sem inoculação em pós-colheita		Com inoculação em pós-colheita
		Início do ciclo**	Final do ciclo***	
Testemunha	18,7a *	32,5a	42,5a	57,5a
Fungicidas	12,5b	15,0b	17,5b	32,5bc
ASM	12,5b	16,6b	17,5b	35,0b
Quitosana 0,5%	10,0b	13,3bc	22,5b	30,0bc
Quitosana 1%	6,25c	10,0c	17,0b	27, 5 c
Quitosana 2%	6,75c	10,0c	25,0b	37,5b
C.V.	8,6	11,5	23,7	14,5

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\* Avaliação após 7 dias da colheita.

\*\*\* Avaliação após 4 dias da colheita.

As podridões observadas foram quase que na totalidade provocadas por *Botrytis cinerea*, fato esse explicável devido ao processo de inoculação em campo e em pós-colheita desse patógeno. O fungo *Botrytis cinerea* causa o mofo-cinzento, sendo comum em todos os locais onde se cultiva o morangueiro, porém é de ocorrência generalizada, e possui registro de ataque em mais de 200 espécies de plantas (HELBIG, 2001). O efeito de quitosana sobre *B. cinerea* foi observado em pimentão (EL GHAOUTH et al., 1994; EL GHAOUTH et al., 1997), maçã, citrus (EL GHAOUTH et al., 2000) e pepino (BEN-SHALOM et al., 2003). O efeito da aplicação de quitosana sobre podridões em morango na pós-colheita, causado por *B. cinerea*, foi relatado por EL GHAOUTH et al. (1992), demonstrando também seu efeito *in vitro* na inibição da germinação de esporos, alongação do tubo germinativo e crescimento da colônia.

Foi observado que o efeito de quitosana sobre podridões pós-colheita está relacionado com a concentração do produto, sendo que a incidência de podridões diminuiu com o aumento desta (Figura 4.1 e Figura 4.2). Na primeira avaliação realizada, na qual considerou-se a incidência de podridões sem o processo de inoculação com *Botrytis*

*cinerea*, a incidência na concentração zero foi de 18,7%, sendo reduzida para 10% na concentração de 0,5% e 6,25% na concentração de 1% (Figura 4.1). Da mesma forma, foi observada na avaliação com inoculação em campo, que apresentou 57,5% de incidência de podridões na concentração zero, sendo reduzida para 30,0% na concentração de 0,5% e 27,5% na concentração de 1% (Figura 4.2). Esses resultados vêm confirmar os obtidos por REDDY et al. (2000), os quais relacionaram o controle de *B. cinerea* com o aumento das concentrações de quitosana.

Segundo EL GHAOUTH et al. (1997), o efeito de quitosana sobre podridões está relacionado à preservação da integridade da membrana e redução da produção de poligalacturonase por *B. cinerea*, bem como no dano direto à citologia da hifa, limitando a habilidade do patógeno de colonizar o tecido.

Quitosana na concentração de 2%, comparando-se com 0,5% e 1%, provocou um acréscimo da incidência de podridões (Figura 4.1 e Figura 4.2). Possivelmente, isso esteja relacionado ao dano causado nos frutos nessa concentração. Esse dano aos frutos foi exclusivamente na concentração de 2%, atingindo uma incidência de 22,5 e 27,5% de frutos, na primeira e segunda avaliação, respectivamente. Esse dano não alterou as características organolépticas dos frutos, mas depreciou-os para o mercado, apresentando uma coloração atípica em comparação aos demais tratamentos, com mais brilho e coloração vermelho púrpura, diferente dos demais, com coloração vermelha intensa.

As avaliações de podridões sem e com inoculação em campo e sem e com inoculação em pós-colheita, realizadas no início e no final do ciclo produtivo, permitiram determinar o efeito da pressão de inóculo sobre a incidência de podridões após os tratamentos. A primeira e a segunda avaliação, no início do ciclo produtivo, foi realizada 7 dias após a colheita e a terceira e quarta avaliação, no final do ciclo produtivo, com apenas 4 dias, pois a incidência de podridões atingia níveis muito elevados, não suportando 7 dias para as avaliações (Tabela 4.3). Essa redução do tempo de avaliação de 7 dias para 4 dias, demonstra o efeito da pressão do inóculo sobre a incidência de podridões.

O ASM atuou de forma eficiente na redução de podridões, similar ao tratamento com fungicidas e destacando-se em relação à testemunha (Tabela 4.3). O efeito de ASM em morangueiros já foi observado para o controle de *B. cinerea* (TERRY & JOYCE, 2000) e *P. fragariae* (EIKEMO et al., 2003).

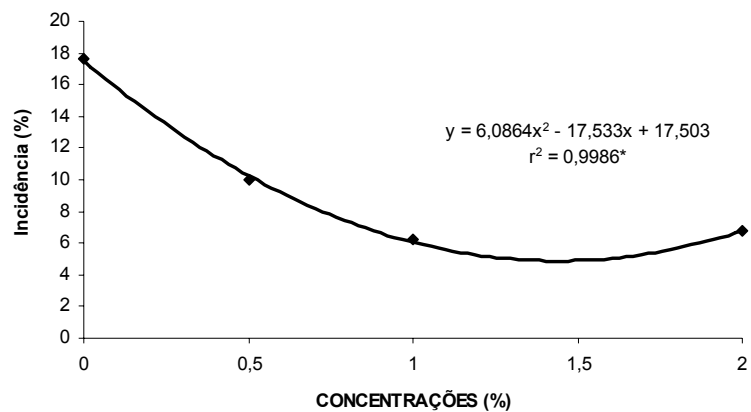


Figura 4.1. Incidência de podridões pós-colheita de frutos de morango cultivar Aromas, sem a inoculação, em função das concentrações de quitosana aplicadas durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004. \*Significativo a 5% de probabilidade de erro.

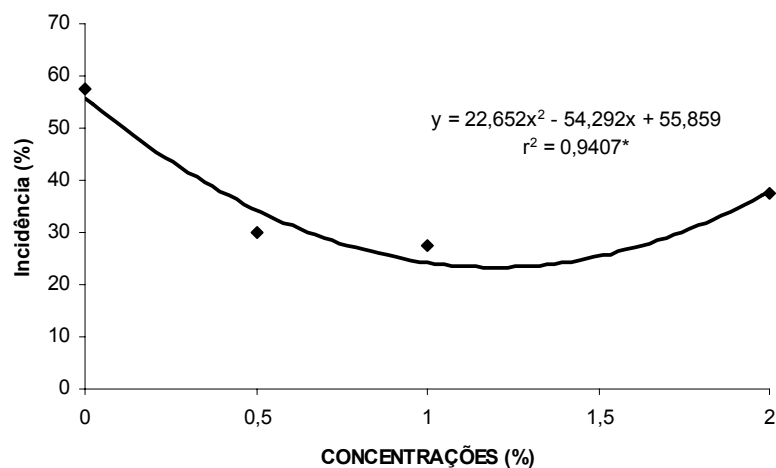


Figura 4.2. Incidência de podridões pós-colheita de frutos de morango cultivar Aromas, com inoculação em campo e em pós-colheita com *Botrytis cinerea*, em função das concentrações de quitosana aplicadas durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004. \*Significativo a 5% de probabilidade de erro.

Os tratamentos com quitosana nas concentrações de 0,5% e 1,0% diminuíram a respiração dos frutos (Tabela 4.4 e Figura 4.3). A redução na taxa respiratória e da atividade da polifenol oxidase pelo uso de quitosana também foi observada em frutos de longan (JIANG & LI, 2001). No presente trabalho, na concentração de 2% ocorreu uma elevação da taxa respiratória em comparação com as concentrações 0,5 e 1% (Figura 4.3). Possivelmente isso se deve ao fato dos frutos nessa concentração terem apresentado

danos. Danos em frutos resultam no aumento do metabolismo, que se torna aparente com o aumento da taxa respiratória (Varoquaux & Wiley, 1997 citado por MORAES, 2005).

A produção de etileno foi reduzida pela aplicação de quitosana nas três concentrações avaliadas em comparação com a testemunha, sendo que a 0,5% não diferiu do tratamento com ASM e fungicidas (Tabela 4.4). A redução na produção de etileno está diretamente relacionada com o aumento das concentrações de quitosana (Figura 4.4).

Quitosana, nas três concentrações avaliadas, manteve mais elevados os valores de polifenóis totais em comparação com a testemunha (Tabela 4.4). Resultados semelhantes foram observados em frutos de lichia tratados com quitosana (ZHANG & QUANTICK, 1997).

Os tratamentos com quitosana nas concentrações de 0,5 e 1,0% e ASM resultaram em menores valores de açúcares redutores em comparação com a testemunha, sendo que na concentração de 2%, observou-se elevação do teor de açúcares redutores (Tabela 4.4). Essa elevação dos açúcares redutores também pode estar relacionada ao dano verificado nos frutos tratados com 2,0% de quitosana. Esse dano pode ter alterado o metabolismo normal da liberação e degradação dos ácidos e açúcares, desencadeado um aumento da atividade metabólica dos frutos, elevando os níveis de açúcares redutores e aumentando a sua respiração. BRACKMANN et al. (2002), avaliando diversas temperaturas no armazenamento de morangos cv. Oso Grande, obtiveram valores mais elevados de açúcares em frutos que sofreram danos por baixa temperatura e conseqüentemente, maior incidência de podridões nesses frutos. EL GHAOUTH et al. (1991) associou o aumento da respiração em morangos com podridões pós-colheita.

Com relação ao teor de antocianinas, ocorreu um discreto aumento na testemunha, em comparação com os demais tratamentos, porém sem diferenças significativas (Tabela 4.4). Isto pode estar relacionado ao aumento das mesmas pelo processo natural de maturação. REDDY et al. (2000) observaram uma relação inversa ao aumento dos valores de antocianinas com o incremento das concentrações de quitosana e direta com a elevação da temperatura e tempo de armazenamento.

A aplicação de quitosana e ASM na pré-colheita não interferiu na qualidade organoléptica dos frutos na pós-colheita, não sendo observado sabor estranho nos frutos pelo grupo de degustadores.



Tabela 4.4. Respiração, produção de etileno, conteúdo de polifenóis totais, antocianinas totais e açúcares redutores de frutos de morangueiro da cultivar Aromas não tratados e tratados na pré-colheita com os elicitores quitosana e acibenzolar-S-metil (ASM) e fungicidas. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004.

Tratamentos	Respiração (mL CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> )	Produção de etileno (uL. C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> )	Polifenóis totais (mg ácido gálico.L <sup>-1</sup> )	Antocianinas (mg.L cloreto de malvidina <sup>-1</sup> )	Açúcares reduzores (g de açúcar reduzidor.100mL <sup>-1</sup> )
Testemunha	47,91a	0,308a	112,5c	0,38ns	7,5a
Fungicidas	46,26b	0,281ab	114,6bc	0,32	3,1bc
ASM	47,46a	0,276ab	114,4bc	0,29	1,6c
Quitosana 0,5%	41,06c	0,245b	120,7a	0,36	1,6c
Quitosana 1,0%	42,32c	0,202c	116,1ab	0,34	1,5c
Quitosana 2,0%	44,06b	0,159c	117,8ab	0,35	4,2b
C.V.	6,64	16,4	12,40	10,98	6,5

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

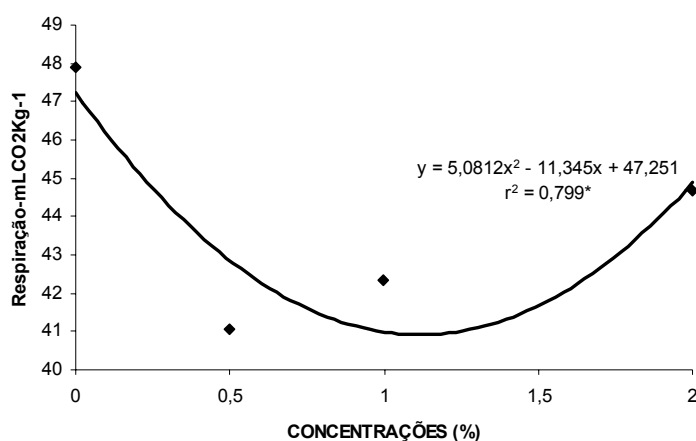


Figura 4.3. Respiração de frutos de morango cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004. \*Significativo a 5% de probabilidade de erro.

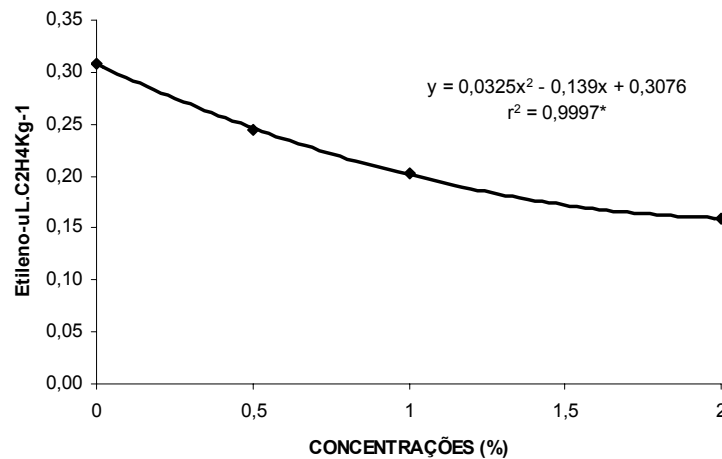


Figura 4.4. Produção de etileno de frutos de morango cultivar Aromas em função das concentrações de quitosana aplicados durante o desenvolvimento da cultura. UTFPR, Dois Vizinhos, PR, 2004. \*Significativo a 5% de probabilidade de erro.

#### 4.4. CONCLUSÕES

A aplicação pré-colheita de quitosana nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% retardou a maturação dos frutos atuando positivamente na manutenção da firmeza de polpa, acidez titulável e perda de massa fresca. Também diminuiu a produção de etileno, o teor de açúcares redutores e manteve mais elevados os teores de polifenóis totais. No entanto, a concentração de 2% de quitosana causou dano aos frutos na pós-colheita elevando a taxa respiratória e o teor de açúcares redutores;

Quitosana induziu à resistência na planta a patógenos, com efeito na diminuição das podridões de frutos na pós-colheita causadas por *Botrytis cinerea*;

O ASM teve efeito na retenção da acidez titulável e atuou na redução de podridões, comparável ao tratamento com fungicidas e superior à testemunha;

A aplicação de quitosana e ASM na pré-colheita não interferiu na qualidade organoléptica dos frutos em pós-colheita.

## REFERÊNCIAS

ALTHAUS, R.A.; CANTERI, M.G.; GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. **Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica**, Parte 1, Ponta Grossa, p.280-281, 2001.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. Washington D.C. 11a ed., p.144-196, 1970.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; GARCÍA-DOMINGUEZ, E.; BARRERA-NECHA, L.L.; REYES-CHILPA, R.; WILSON C.L. Seasonal evaluation of postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.29, p.81-93, 2003.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; VALLE, M.G.V.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BARKA, E.A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON C.L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, Oxford, v.25, p.108-118, 2006.

BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, Oxford, v.22, p.285-290, 2003.

BHASKARA-REDDY, B.M.V.; AIT BARKA, E.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Science Technology**, New York, v.8, p.33-43, 1998.

BRACKMANN, A.; FREITAS, S.T.; MELLO, A.M.; NEUWALD, D.A. Efeito da temperatura de armazenamento sobre a qualidade do morango cultivar 'Oso Grande'. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.1, p.77-78, 2002.

BRACKMANN, A.; HUNSCHE, M.; WACLAWOVSKI, A.; DONAZZOLO, J. Armazenamento de morangos cv. Oso Grande (*Fragaria x ananassa* L.) sob elevadas presões parciais de CO<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.1, p.10-14, 2001.

DI-STEFANO, R.; CRAVERO, M.C.; GENTILINI, N. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. **L`Enotecnico**, p.83-89, 1989.

EIKEMO, H.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A.M. Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, n.4, p.345-350, 2003.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, p.398-402, 1992.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; PONNAMAPALAM, R.; BOULET, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, p.1618-1620, 1991.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.44, p.417-432, 1994.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.12, p.183-194, 1997.

EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J.L.; WILSON, C.L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.19, p.103-110, 2000.

GIL, M.I.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A. A. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.5, p.1662-1667, 1997.

HAN, C.; ZHAO, Y.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v.33, p.67-78, 2004.

HELBIG, J. Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 149, p. 265-273, 2001.

JIANG, Y.; LI, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, United Kingdom, v.73, p.139-143, 2001.

KATZ, V.A.; THULKE, O.U.; CONRATH, U. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, p.1333-1339, 1998.

LANE, J. H.; EYNON, L. Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator. **Norman Rodge**, London, 8p., 1934.

LI, C.; KADER, A.A. Residual effect of controlled atmospheres on postharvest physiology and quality of strawberries. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, p.629-634, 1989.

MATHUR, N. K.; NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, Easton, v.67, n.11, p.938-942, 1990.

MORAES, I.V.M. **Morango processado minimamente e conservado sob refrigeração e atmosfera controlada**. Campinas, 2005. 98p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

PAULUS, A.O. Fungal diseases of strawberry. **HortScience**, Alexandria, v.25, p.885-889, 1990.

REDDY, M.V.B.; BELKACEMI, K.; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.20, p.39-51, 2000.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; VENERE, DI.; SALERNO, M. Effects of Pre-and postharvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v.67, p.1862-1867, 2002.

SATHIYABAMA, M.; BALASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection**, Oxford, v.17, p.307-313, 1998.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetric of total phenols with phosphoromolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.20, n.3, p.144-158, 1965.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3<sup>o</sup> ed., Nova York: McGraw-Hill, 1997, 666p.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, Paulo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Suppression of grey mould on strawberry fruit with the chemical plant activator acibenzolar. **Pest Management Science**, Hoboken, v.56, p.989-992, 2000.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science Society of America**, Madison, v.44, p.1920-1934, 2004.

WRIGHT, K.P.; KADER, A.A. Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmons. **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v.10, n.1, p.39-48, 1997.

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**, Amsterdam, v.12, 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**, Ashford, v.73, p.763-767, 1998.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores – SANEST**. Pelotas:UFPel, Instituto de Física e Matemática, 1984, 150p.

## 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização dos indutores de resistência quitosana e ASM demonstraram possuir atuação nos processos metabólicos nas plantas e nos frutos de morangueiro, com ação sobre parâmetros agronômicos, fisiológicos e bioquímicos. Algumas considerações, portanto, podem ser feitas em função dos resultados obtidos:

Na planta, o uso dos indutores quitosana nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% e ASM na concentração de 0,0025%, na frequência de aplicação de 7 dias, aplicados em morangueiro, não causou perda metabólica que comprometesse a produtividade da cultura. Quitosana nas três concentrações avaliadas e ASM atuaram positivamente sobre a redução da mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) e flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) em morangueiro, apresentando potencial para utilização na cultura. Tais indutores parecem atuar ativando rotas do metabolismo secundário para compostos relacionados à patogenicidade, bem como ativação de proteínas relacionadas à patogenicidade, como as  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases.

As respostas do uso dos indutores em pré-colheita sobre os parâmetros pós-colheita demonstraram que quitosana nas concentrações de 0,5%; 1,0% e 2,0% retardaram a maturação dos frutos atuando positivamente na manutenção da firmeza de polpa, acidez titulável e perda de massa fresca. Diminuíram a produção de etileno, o teor de açúcares redutores e mantiveram mais elevados os teores de polifenóis totais. No entanto, a concentração de 2% de quitosana causou dano aos frutos na pós-colheita elevando a taxa respiratória e o teor de açúcares redutores. Quitosana induz a resistência na planta a patógenos, com efeito na diminuição das podridões de frutos na pós-colheita causadas por *Botrytis cinerea*. O ASM tem efeito na retenção da acidez titulável e atuou na redução de podridões, comparável ao tratamento com fungicidas e superior à testemunha. A aplicação de quitosana e ASM na pré-colheita não interferiu na qualidade organoléptica dos frutos em pós-colheita.

Considerando conjuntamente os dados obtidos sobre o comportamento dos indutores na planta e nos frutos, as concentrações de 0,5% e 1% de quitosana parecem ser as mais indicadas, pois atuaram de forma favorável sobre o comportamento de doenças nas plantas e não causaram danos aos frutos na pós-colheita. O uso do ASM, nesse trabalho utilizado como um produto indutor de referência, demonstrou boa performance e potencial de uso na cultura do morangueiro.



Outros trabalhos de pesquisa devem dar continuidade a essas respostas obtidas em morangueiro pelo uso dos indutores quitosana e ASM, em função da sua complexidade e atuação nas plantas. Pesquisas devem ser complementadas com relação a condições ambientais, nutricionais, cultivares, patógenos, pressão de inóculo, frequência de aplicação dos indutores, entre outros fatores relacionados à resposta da planta sobre o uso desses indutores, para que em um futuro próximo se permita utilizá-los de forma segura e eficiente.