

Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana

Fábio Rossi Cavalcanti⁽¹⁾, Mário Lúcio Vilela de Resende⁽²⁾, Ricardo Borges Pereira⁽²⁾, João de Cássia do Bonfim Costa⁽³⁾ e Cristina Paiva da Silveira Carvalho⁽⁴⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Piauí, Campus Profa. Cinobelina Elvas, CEP 64900-000 Bom Jesus, PI. ⁽²⁾Universidade Federal de Lavras, Dep. de Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: mlucio@ufla.br, ricardoborgespereira@yahoo.com.br ⁽³⁾Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Seção de Fitopatologia, Caixa Postal 07, CEP 45650-000 Itabuna, BA. E-mail: jbcosta@uol.com.br ⁽⁴⁾Universidade Federal do Ceará, Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, Caixa Postal 6020, CEP 60451-970 Fortaleza, CE. E-mail: crispaivas@yahoo.com.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de eliciadores biológicos e químicos sobre as atividades de duas proteínas relacionadas à patogênese (PR), quitinase e beta-1,3-glucanase, em folhas de tomateiro, e avaliar o potencial desses eliciadores na redução do progresso da mancha-foliar causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Plantas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada foram pulverizadas com: acibenzolar-S-metil (ASM; 0,2 g L⁻¹); formulação biológica proveniente de biomassa cítrica, denominada Ecolife (5 mL L⁻¹); suspensão de quitosana (MCp; 200 g L⁻¹), proveniente de micélio de *Crinipellis perniciosa*; extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados por *C. perniciosa* (VLA; 300 g L⁻¹). As plantas foram desafiadas com um isolado virulento da bactéria, quatro dias depois das pulverizações. Plantas pulverizadas com extratos biológicos mostraram redução da mancha-bacteriana. ASM proporcionou 49,3% de proteção, e foi igual à MCp e Ecolife e superior ao VLA. Este último não diferiu significativamente de MCp e Ecolife. Observou-se maior atividade das duas enzimas nas plantas tratadas, principalmente nas primeiras horas após as pulverizações.

Termos para indexação: *Solanum lycocarpum*, *Xanthomonas campestris*, acibenzolar-S-metil, extratos biológicos, resistência induzida.

Chitinase and beta-1,3-glucanase activities after the elicitation of tomato defenses against bacterial spot

Abstract – The objective of this work was to assess the influence of foliar application of resistance inducers and the activation of plant pathogenesis-related (PR) proteins, chitinases and beta-1,3-glucanases, against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, and evaluate the potential of these elicitors on the reduction of bacterial leaf spot. Tomato plants of the cultivar Santa Cruz Kada were sprayed with: acibenzolar-S-methyl (0.2 g L⁻¹ ASM); Ecolife, a biological formulation based on citric biomass (5 mL L⁻¹); chitosan suspension from *Crinipellis perniciosa* mycelium (MCp; 200 g L⁻¹); an aqueous extract from branches of lobeira (*Solanum lycocarpum*) infected with *C. perniciosa* (VLA; 300 g L⁻¹). Plants were challenged with a virulent bacterial strain four days after spraying. Plants sprayed with the tested substances showed reduction of bacterial spot. ASM provided 49.3% protection, and was equal to MCp and Ecolife, and superior to VLA. VLA treatment did not differ statistically from MCp and Ecolife. Increases of beta-1,3-glucanase and chitinase activities were observed in treated plants at the first hour after spraying.

Index terms: *Solanum lycocarpum*, *Xanthomonas campestris*, acibenzolar-S-methyl, biological extracts, induced resistance.

Introdução

A mancha-bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, é uma doença que se desenvolve preferencialmente em ambiente quente e úmido, e limita a produtividade de lavouras comerciais de tomateiro no Brasil (Kimura & Carmo, 1996).

Estratégias de controle são baseadas em uma combinação de práticas, tais como: uso de sementes ou mudas livres do patógeno; eliminação de hospedeiros alternativos; adoção de cultivares resistentes e controle químico (Obradovic et al., 2004). Entre as estratégias para o controle da mancha-bacteriana, destaca-se a ativação das defesas naturais da planta, por meio da indução de resistência sistêmica adquirida (RSA) (Louws et al., 2001).

Moléculas eliciadoras podem ativar resistência sistêmica, que protege os tecidos contra o ataque subsequente de uma ampla variedade de patógenos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). A RSA é expressa tanto local quanto sistemicamente, em resposta a patógenos que causam lesões necróticas. A resistência expressa está associada ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e é mediada por um processo dependente do ácido salicílico. Outros processos de defesa podem ser incluídos, como explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento de parede (Durrant & Dong, 2004).

Embora as proteínas PR estejam envolvidas na defesa de plantas, elas não são necessariamente identificadas por sua ação antipatogênica, mas sim por seu simples acúmulo em plantas submetidas à situação de patogênese (Van Loon, 1997). Entre as PR, encontram-se hidrolases como as beta-1,3-glucanases (PR-2; EC 3.2.1.39) e quitinases (PR-3; EC 3.2.1.14), que têm sido relatadas principalmente como inibidoras do crescimento fúngico (Van Loon & Van Strien, 1999). Essas proteínas, especificamente as quitinases, apresentam ação antibacteriana, em razão fundamentalmente, de sua ação lisozímica sobre a parede celular (Stintzi et al., 1993). Apesar disto, existem poucos estudos sobre enzimas hidrolíticas PR-2 e PR-3 e sua ação sobre a colonização bacteriana na planta.

Eliciadores sintéticos, como o ASM (éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotiólico), parecem atuar similarmente ao ácido salicílico e também induzem RSA contra bactérias, fungos e vírus (Cole, 1999; Resende et al., 2002). Semelhante ativação do sistema de defesa de planta ocorre mediante a aplicação exógena de quitosana, ou certos químicos, tais como, ácido 2,6 dicloro isonicotínico (INA); ácido beta-aminobutírico (BABA) e metil-jasmonato (MeJA) (Hwang et al., 1997).

Além de químicos e compostos específicos, trabalhos têm demonstrado que plantas reconhecem eliciadores derivados da superfície celular de microrganismos, os quais induzem respostas de defesa tanto em plantas hospedeiras como em não hospedeiras. Estes incluem peptídeos, carboidratos, glicoproteínas e lipídios (Nürnberg & Brunner, 2002). Além disso, proteínas PR e poligalacturanases de patógenos podem hidrolisar substratos da parede celular do patógeno ou hospedeiro, causando eliciação indireta pela liberação de produtos eliciadores não específicos, no ambiente apoplástico (Van Loon, 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de eliciadores biológicos e químicos sobre as atividades de duas proteínas PR, quitinase e beta-1,3-glucanase, em folhas de tomateiro, e avaliar o potencial desses eliciadores na redução do progresso da mancha-foliar causada por *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, entre fevereiro e março de 2004. Para a quantificação da severidade da mancha bacteriana, e no intuito de se avaliar o potencial da indução de resistência pelas substâncias estudadas, sementes de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada foram plantadas em substrato composto de areia, matéria orgânica seca e vermiculita (2:1:1), acondicionado em vasos de 3 L. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com média de temperatura diurna e noturna de 31 e 24°C, respectivamente, umidade relativa de 43 a 85%, fotoperíodo de 12 horas, e densidade máxima de fluxo de fótons entre 410 e 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medido na planta. O experimento foi realizado em blocos ao acaso, com cinco repetições, tendo sido considerado como unidade experimental um vaso com quatro plantas.

Os tratamentos consistiram de acibenzolar-S-metil (ASM), usado a partir do produto comercial Bion. A diluição experimental foi fixada em 0,2 g L⁻¹ de ASM, em água destilada.

A dosagem estimada para pulverização de Ecolife em folhas de tomateiro (5 mL L⁻¹ de Ecolife em água destilada), foi baseada em experimentos preliminares para acompanhamento de fitotoxidez, conforme as recomendações do fabricante.

Frações heterogêneas de quitosana, provenientes de micélio de *Crinipellis pernicioso* (MCp), foram obtidas a partir do cultivo de micélio. De uma cultura axênica dessa espécie, foi repicado um disco de micélio para uma solução nutritiva composta por batata, dextrose e água estéril (2:0,2:10, m/m/v); o conjunto foi deixado sob agitação constante (100 rpm) em agitador orbital. Depois de 15 dias, a biomassa obtida (60 g) foi filtrada a vácuo, para separação do caldo nutriente. Em seguida, a biomassa foi exaustivamente lavada, ressuspensa em 200 mL de água destilada e transferida para um balão de 1.000 mL, onde recebeu tratamento térmico de 100°C, durante uma hora em refluxo. Depois do resfriamento, o micélio foi novamente filtrado, e as fases sólidas foram separadas e secadas ao ar.

Em seguida, as amostras receberam o tratamento para extração de quitosana simplificado, segundo Synowiecki & Al-Khateeb (1997). Vinte gramas de massa fúngica foram misturados a NaOH 2% em proporção 1:30 (p/v) e tratados termicamente, por 2 horas, a 90°C para desproteinização. Em seguida o sistema foi centrifugado a 4.000 g por 15 min e o sobrenadante descartado. O material recebeu lavagem até equilibrar-se o pH em 7. O material obtido foi pesado e misturado à solução de ácido acético 10%, na proporção de 1:40 (p/v). O sistema permaneceu a 60°C durante 6 horas, para a extração de quitosana. O material foi novamente filtrado e exaustivamente lavado, e a biomassa tratada foi transferida para um misturador com água destilada q.s.p. 1:5 (p/v), em que permaneceu sob condição de desintegração até a obtenção de uma suspensão finamente dividida. A amostra foi acondicionada em freezer, a -20°C, para uso experimental.

Ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*), arbusto hospedeiro silvestre de *C. perniciosa*, infectado e necrosado por esse fungo, foram coletados para secagem a 60°C, por 24 horas, e posterior trituração seguida de moagem. O pó obtido do tecido necrosado (90 g) foi ressuspenso em 300 mL de água destilada e submetido a tratamento térmico de 100°C, durante 1 hora, em refluxo. Depois do resfriamento, o extrato foi filtrado a vácuo, e a amostra foi congelada em freezer, a -20°C, para uso experimental, e foi denominado VLA. Ramos sadios de lobeira também foram coletados e, analogamente, foi produzido o pó para ser utilizado na produção do extrato aquoso, a ser utilizado como controle específico do VLA.

O isolamento de *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi realizado a partir de folhas naturalmente infectadas de tomateiro, em meio 523 de Kado & Heskett (1970). Posteriormente, a bactéria foi incubada nesse mesmo meio, à temperatura de 28°C, para preparação das suspensões antes da inoculação. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540} = 0,20$, correspondente a aproximadamente 10^{11} ufc L⁻¹. A inoculação foi realizada via pulverização foliar, em plantas de tomate com 20 dias de semeadura, até o ponto de escorrimento. A seguir, as plantas foram transferidas para câmara úmida, à temperatura de 28°C, onde permaneceram por 12 horas, antes de serem transportadas de volta à casa de vegetação.

Plantas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada, 15 dias após a semeadura, foram pulverizadas com

ASM (0,2 g L⁻¹), Ecolife (5 mL L⁻¹), MCp (200 g L⁻¹) e VLA (300 g L⁻¹) até o ponto de escorrimento. Depois de quatro dias, as plantas pulverizadas com os tratamentos e as pulverizadas com água destilada (controle) receberam inoculação da suspensão de *X. vesicatoria* e foram avaliadas aos 3, 6, 9, 12, 15 e 20 dias após a inoculação (dai). Para se avaliar a eficiência dos extratos testados na proteção de plantas, foi adaptada uma escala de notas baseada em Sidhu & Webster (1977). A severidade da doença foi quantificada por meio de análise visual, convertida em porcentagem de severidade, seguindo-se uma escala (1–4) de área foliar lesionada: 1, 0–25%; 2, 26–50%; 3, 51–75%; 4, mais de 75%. Ao final das avaliações, o somatório das notas por folha foi dividido pelo número total de folhas avaliadas em cada planta. O cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) seguiu a relação de Campbell & Madden (1990). A proteção da planta foi estimada pela relação 1-x/y, em que x representa AACPD das plantas tratadas, e y representa AACPD dos controles com inoculação (Li et al., 1996). A massa da matéria fresca e a taxa diária de crescimento da parte aérea de plantas de tomateiro foram avaliadas ao final do período experimental aos 20 dai.

Na coleta de tecido foliar fresco, a fim de se realizarem as determinações bioquímicas, sementes de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada foram imersas em álcool etílico a 1% v/v e hipoclorito de sódio 0,1% v/v, por um min, em cada solução, lavadas com água destilada e, em seguida, postas para germinar em recipientes de 400 mL, com areia textura média, exaustivamente lavada e esterilizada. Depois da emergência, as plântulas foram regadas diariamente com 1:10 da solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). As plantas foram mantidas na mesma casa de vegetação utilizada no experimento de quantificação da mancha-bacteriana, com condições similares de temperatura, umidade e de fotoperíodo descritas. O experimento foi instalado em blocos casualizados, com três repetições e a unidade experimental foi composta por uma planta em um recipiente de 400 mL. Plantas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada, 15 dias após a semeadura, foram pulverizadas com ASM (0,2 g L⁻¹), Ecolife (5 mL L⁻¹), MCp (200 g L⁻¹) e VLA (300 g L⁻¹) até o ponto de escorrimento. Amostras de plantas tratadas e das testemunhas pulverizadas com água foram coletadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após as pulverizações (hap), e 3, 6, 9 e 12 dias após as pulverizações (dap). A inoculação da suspensão de *X. vesicatoria* foi

realizada 4 dap em plantas tratadas e em testemunhas pulverizadas com água destilada. Tratamentos com pulverização e inoculação foram coletados somente aos 6, 9 e 12 dap, assim como seus respectivos controles. Antes de cada coleta, às 9h, as plantas foram transferidas para uma câmara ajustada para 27°C, 75% de umidade relativa e $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons, por uma hora. Em seguida, as folhas foram coletadas, homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente utilizadas para determinações bioquímicas.

Quanto às determinações enzimáticas, o tecido foliar (1 g) foi homogeneizado em almofariz com 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, com EDTA 0,1 mM, durante 5 min, em banho de gelo. Depois da filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 13.000 g por 15 min, e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. Todos os passos foram executados a 0–4°C. A determinação da concentração de proteína solúvel contida nos extratos foi realizada pelo ensaio de Bradford (1976), tendo-se usado um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de quitinases foi determinada pela adição de 70 μL do extrato enzimático à solução com 130 μL de acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 60 μL de CM-Chitin-RBV (2 mg mL^{-1}), substrato específico para quitinase fornecido por Loewe Biochemica GmbH, em microplacas de 96 cavidades, com capacidade de 350 μL . Depois da incubação a 35°C, por 80 min, as amostras foram acidificadas com 50 μL de HCl 0,5 N, resfriadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas (1.450 g por 10 min). Alíquota de 210 μL do sobrenadante de cada amostra foi transferida para uma nova microplaca para leitura a 492 nm, em um leitor EIA-compatível (Wirth & Wolf, 1990). A atividade de beta-1,3-glucanases foi medida seguindo método análogo, apenas com a troca do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL^{-1}) e com o ajuste da alíquota do extrato enzimático para 100 μL (deduzido o volume do tampão acetato, a fim de se ajustar o volume final em 310 μL por cavidade). Para promover a ação hidrolítica da beta-1,3-glucanase foi adotado tempo de incubação de 35°C por 100 min. As amostras foram, então, medidas fotometricamente em filtro de 620 nm de um leitor EIA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A eletroforese em gel de poli(acrilamida), em condições nativas, foi feita de acordo com Laemmli (1970), usando-

se um gel de separação de 12,5%, sobreposto por um gel de empilhamento de 5%. Extratos enzimáticos foram preparados em presença de azul de bromofenol e glicerol. O volume referente ao valor fixo de 15 μg de proteína, de cada amostra, foi adicionado aos poços do gel de empilhamento. Para revelação de atividade quitinásica no gel, glicol-quitina 0,01% (m/v) foi misturado ao gel de separação dos ensaios, deduzindo-se o valor referente da solução no volume da água Milli-Q usada. Depois da corrida, o gel foi submergido em calcoflúor branco m^2R , diluído em Tris-HCl 0,5N, pH 8,9, por 5 min e, em seguida, lavado. Finalmente, o gel foi incubado a 38°C, por 12 horas, antes do registro fotográfico por exposição a UV. Perfis eletroforéticos foram apresentados em forma negativa, com atividade lítica em bandas escuras (Trudel & Asselin, 1989).

Experimentos *in vitro* de inibição do crescimento de *X. vesicatoria* foram realizados com os químicos e extratos estudados, nas mesmas concentrações utilizadas nos testes em planta, tendo-se utilizado sulfato de estreptomicina 1.000 mg L^{-1} e água esterilizada, como testemunhas. Esses experimentos foram realizados com o objetivo de examinar o potencial de inibição direta sobre a bactéria, por parte das substâncias estudadas, tendo sido realizados em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Todas as substâncias foram filtradas em membrana Millipore de 0,22 μm e submetidas ao teste, seguindo método de Samy et al. (1999), adaptado. Discos de papel-filtro de 6 mm de diâmetro foram embebidos com 20 μL de cada substância testada, secados à temperatura ambiente, em placa de Petri com meio 523, em que 100 μL da suspensão de *X. vesicatoria* foram previamente espalhados de modo uniforme. A presença e diâmetro de halos de inibição foram avaliados 48 horas depois da incubação em câmara de crescimento, ajustada para 28°C, no escuro.

Estatística descritiva, análise de variância, testes F e Tukey a 5% de probabilidade foram calculados com o procedimento General Linear Model (GLM) do SAS (SAS Institute, 2000).

Resultados e Discussão

As substâncias testadas foram efetivas em reduzir o avanço da mancha-foliar bacteriana (Figura 1 A). Em condições de casa de vegetação, os primeiros sintomas de mancha-bacteriana nas folhas das plantas com inoculação, pré-tratadas ou não, foram detectados cerca de 50 horas após a inoculação.

De maneira geral, em plantas pulverizadas com as substâncias testadas, valores de severidade da doença atingiram um patamar máximo aos 9 dai (dias após a inoculação de *X. vesicatoria*), não tendo progredido nos dias subsequentes da avaliação até 20 dai.

Os melhores resultados obtidos quanto à redução da severidade foram nos tratamentos com ASM e MCp, previamente à inoculação de *X. vesicatoria*. O tratamento com ASM proporcionou 49,3% de

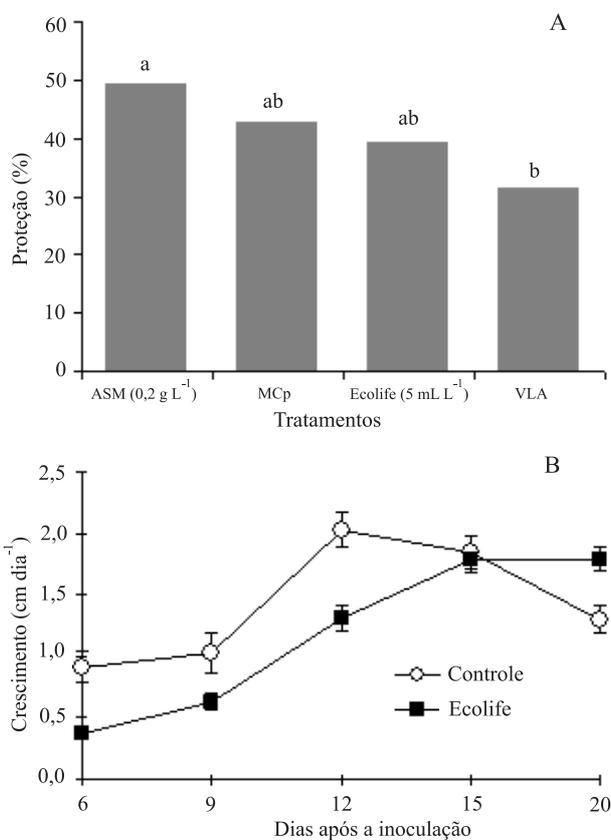


Figura 1. A) Porcentagem de proteção do tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada, contra a mancha-foliar, causada por *Xanthomonas vesicatoria*, 20 dias após a inoculação. As substâncias testadas foram pulverizadas nas folhas 15 dias após o plantio, e as plantas foram submetidas à inoculação quatro dias após a pulverização. Porcentagens de proteção foram obtidas a partir das AACPD, após seis avaliações (controle = 0% de proteção). Colunas com letras iguais não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. B) Taxa de crescimento da parte aérea de plantas pulverizadas com Ecolife e de plantas-controle (pulverizadas somente com água destilada e inoculadas). Barras de erros indicam o desvio-padrão da média.

proteção e foi igual aos tratamentos com MCp e Ecolife e superior ao VLA. Este último não diferiu do MCp e do Ecolife. O controle do VLA (extrato do pó de ramos sadios de lobeira) não promoveu redução significativa da AACPD em plantas com inoculação, ao longo do período experimental.

Plantas pulverizadas com Ecolife apresentaram redução significativa na massa de matéria fresca da parte aérea, em comparação com plantas pulverizadas com água destilada, com inoculação ou sem inoculação (sadias). Entretanto, plantas tratadas com as demais substâncias não mostraram redução significativa de massa de matéria fresca da parte aérea, quando comparadas às plantas sem inoculação. A taxa de crescimento das plantas pulverizadas com as substâncias testadas não diferiu da taxa de crescimento das plantas-controle, com pulverização de água destilada e inoculação, exceto no tratamento com Ecolife, o qual desencadeou significativa redução no crescimento da parte aérea (Figura 1 B). A queda constante na taxa de crescimento e o acúmulo de matéria fresca, em plantas tratadas com Ecolife, podem ser explicados parcialmente pelo significativo acúmulo de lignina, medido em folhas nessas plantas nos mesmo período experimental.

Para serem considerados indutores de resistência, compostos químicos ou biológicos não devem possuir atividade inibitória direta sobre o microrganismo patogênico (Kessman et al., 1994). Na Tabela 1, estão registrados os efeitos in vitro das substâncias utilizadas na proteção de plantas de tomateiro sobre o crescimento radial de *X. vesicatoria*. Com exceção de Ecolife, que produziu inibição significativa de crescimento em cultura da bactéria, nenhuma das demais substâncias testadas promoveu o aparecimento de halo de inibição.

Paralelamente à redução da severidade da mancha-bacteriana promovida por ASM, MCp, Ecolife e VLA sobre

Tabela 1. Efeitos in vitro de ASM, Ecolife, MCp e VLA sobre a inibição do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*⁽¹⁾.

Tratamento	Halo de inibição (mm)
Estreptomicina (1.000 ppm)	20,8±0,83a
Água	0,0±0,0
Ecolife (5 mL L ⁻¹)	13,8±0,43b
ASM (0,2 g L ⁻¹)	0,0±0,0
MCp	0,0±0,0
VLA	0,0±0,0

⁽¹⁾Valores com letras distintas diferem entre si, de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.

as plantas, houve também aumento relativo das atividades de quitinases e beta-1,3-glucanases (Figuras 2 e 3). Plantas de tomateiro pulverizadas com as substâncias testadas, sem inoculação de *X. vesicatoria* (Figura 2), mostraram aumento significativo na atividade de quitinases em folhas, logo à primeira hora após a pulverização, em relação a plantas pulverizadas com água e sem inoculação. Essa diferença permaneceu relativamente constante até 48 hap. A atividade da mesma enzima também foi medida entre 3 e 12 dap. Nesse intervalo, a atividade de quitinases em plantas pulverizadas com Ecolife e VLA, sem inoculação, manteve valores discretamente mais altos que as respectivas plantas pulverizadas com água, e que as pulverizadas com água e com inoculação.

Plantas pulverizadas com ASM e MCp não manifestaram a mesma tendência de atividade de quitinases entre 6 e 12 dap, também não diferiram de seus respectivos controles com inoculação e sem inoculação, porém com tendência de incremento. Em plantas de tomate pulverizadas com as substâncias testadas, e com inoculação de *X. vesicatoria*, a atividade de quitinases não mostrou diferença significativa, entre 3 e 12 dap, com relação aos respectivos controles pulverizados com água e com inoculação – exceto em plantas pulverizadas com Ecolife e VLA aos 9 dap –, principalmente aos 9 e 12 dap. Esses resultados sugerem que as atividades incrementadas de quitinases, promovidas pelos eliciadores testados, acontecem principalmente às primeiras horas após as pulverizações, sustentando-se de modo discreto a partir de 3 dap.

Plantas de tomateiro pulverizadas com MCp e Ecolife, sem inoculação de *X. vesicatoria* (Figura 3), também mostraram aumento na atividade de beta-1,3-glucanases em folhas, à primeira hora após a pulverização, em relação a plantas pulverizadas com água e sem inoculação. Plantas pulverizadas com ASM e VLA apresentaram aumentos somente a partir de quatro hap. A atividade da mesma enzima também foi medida entre 3 e 12 dap. Nesse intervalo, a atividade de beta-1,3-glucanases, em plantas pulverizadas com MCp, Ecolife e VLA, não diferiu das respectivas plantas pulverizadas com água e das pulverizadas com água e submetidas à inoculação. Apenas plantas pulverizadas com ASM manifestaram tendência de aumento de atividade de beta-1,3-glucanases entre 3 e 12 dap, por vezes não-significativas, como por exemplo em 6 dap.

Mecanismos de defesa podem ser induzidos em plantas nas quais faltam genes de resistência, por meio de inoculação de microrganismos não patogênicos, por meio de inoculações de patógenos restritos e por meio de compostos químicos (Kessman et al., 1994). Muitos oligossacarídeos, proteínas e glicoproteínas, originados de fungos e bactérias, podem funcionar como eliciadores não específicos, para induzir respostas de defesa em plantas que carreguem genes R não específicos (Nürnberg & Brunner, 2002).

As substâncias biológicas utilizadas neste trabalho foram preparadas com vistas à obtenção de eliciadores heterogêneos, a partir da fragmentação do caule de *S. lycocarpum* infectado pelo fungo causador da vassoura-de-bruxa *C. pernicioso* (VLA), e derivados de quitosana provenientes de parede de *C. pernicioso* (MCp). Quitina, um polissacarídeo linear, composto de resíduos de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosose (GlcNAc), em ligações β (1-4), e quitosana, um polissacarídeo parcialmente N-acetilado derivado da quitina, composto por ligações β (1-4) de GlcNAc e 2-amino-2-deoxi- β -glucopiranosose (GlcN), são componentes de parede celular fúngica e são relatados como supressores de muitas doenças de planta, por induzir-lhes resistência (Benhamou et al., 1998; Ben-Shalon et al., 2002).

O acibenzolar-S-metil (ASM) tem sido exaustivamente estudado, ao longo dos anos, como potencial indutor químico de resistência e iniciador de RSA (Cole, 1999; Godard et al., 1999; Resende et al., 2002). Resultados deste trabalho indicam que ASM, Ecolife, MCp e VLA, quando pulverizados em plantas, quatro dias antes da inoculação de *X. vesicatoria*, promovem aumento nas atividades de quitinases e beta-1,3-glucanases, principalmente a partir das horas iniciais depois da aplicação. Paralelamente, foi observada proteção do tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada, com relação ao avanço da mancha-foliar bacteriana, nas plantas pulverizadas com as substâncias testadas. De fato, medidas de atividades de quitinases e beta-1,3-glucanases foram os primeiros indicativos da ativação de respostas de defesa das plantas, a partir da aplicação dos eliciadores em teste.

A despeito das respostas afirmativas, uma correlação estreita entre as enzimas estudadas e suas funções hidrolíticas, no contra-ataque da planta à infecção

bacteriana, ainda é pouco conhecida. Por sua vez, quitinasas purificadas podem liberar oligômeros de

quitina, a partir da parede celular fúngica, como também podem agir semelhantemente à lisozima, sobre pa-

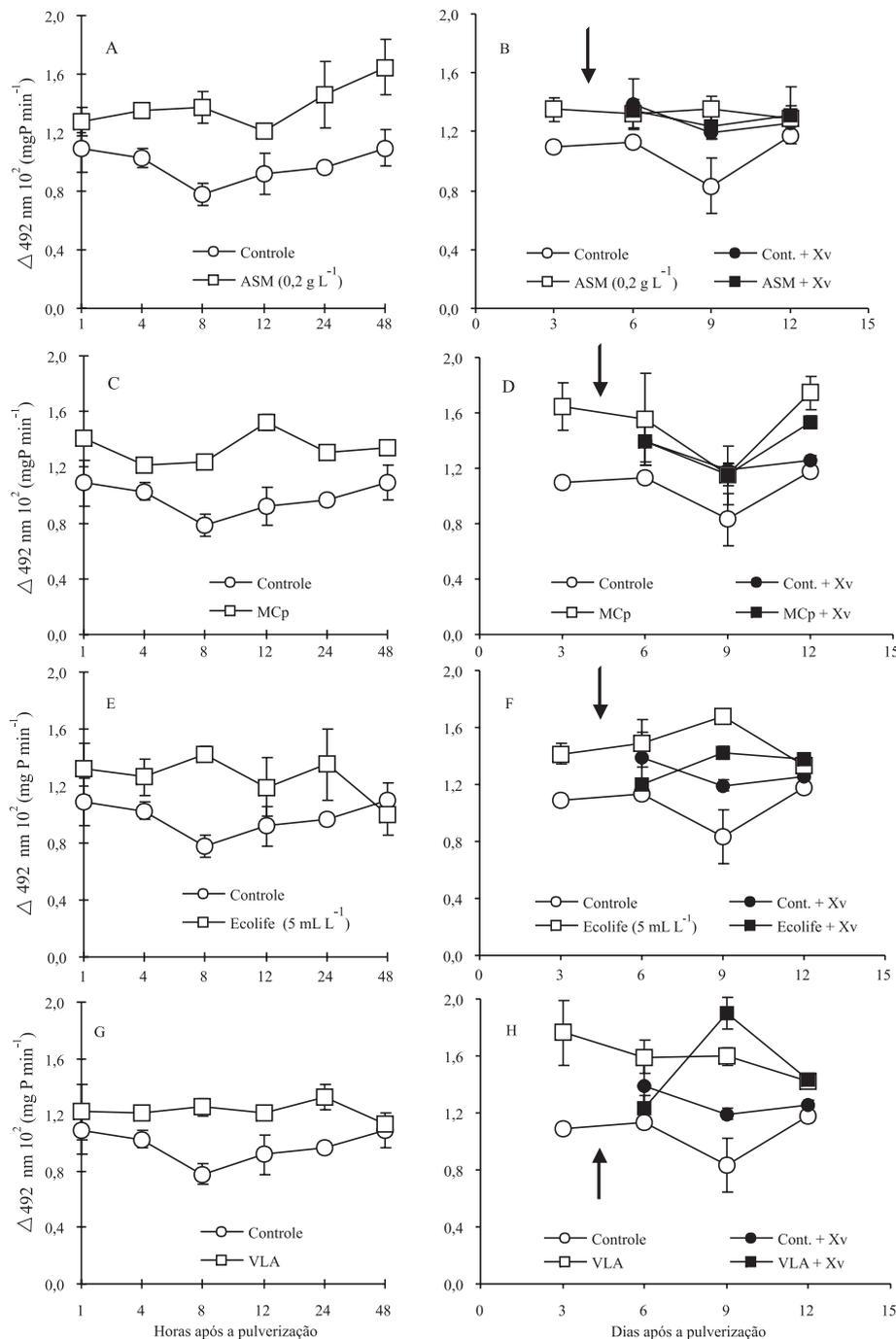


Figura 2. Atividade de quitinasas em folhas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada, susceptível a *Xanthomonas vesicatoria*. Plantas foram pulverizadas 15 dias após o plantio: A e B com ASM (0,2 g L⁻¹); C e D com MCp (200 g L⁻¹); E e F com Ecolife (5 mL L⁻¹); G e H com VLA (300 g L⁻¹). Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas e 3, 6, 9 e 12 dias após as pulverizações. Barras de erros indicam desvio-padrão da média. Setas indicam o momento da inoculação da bactéria.

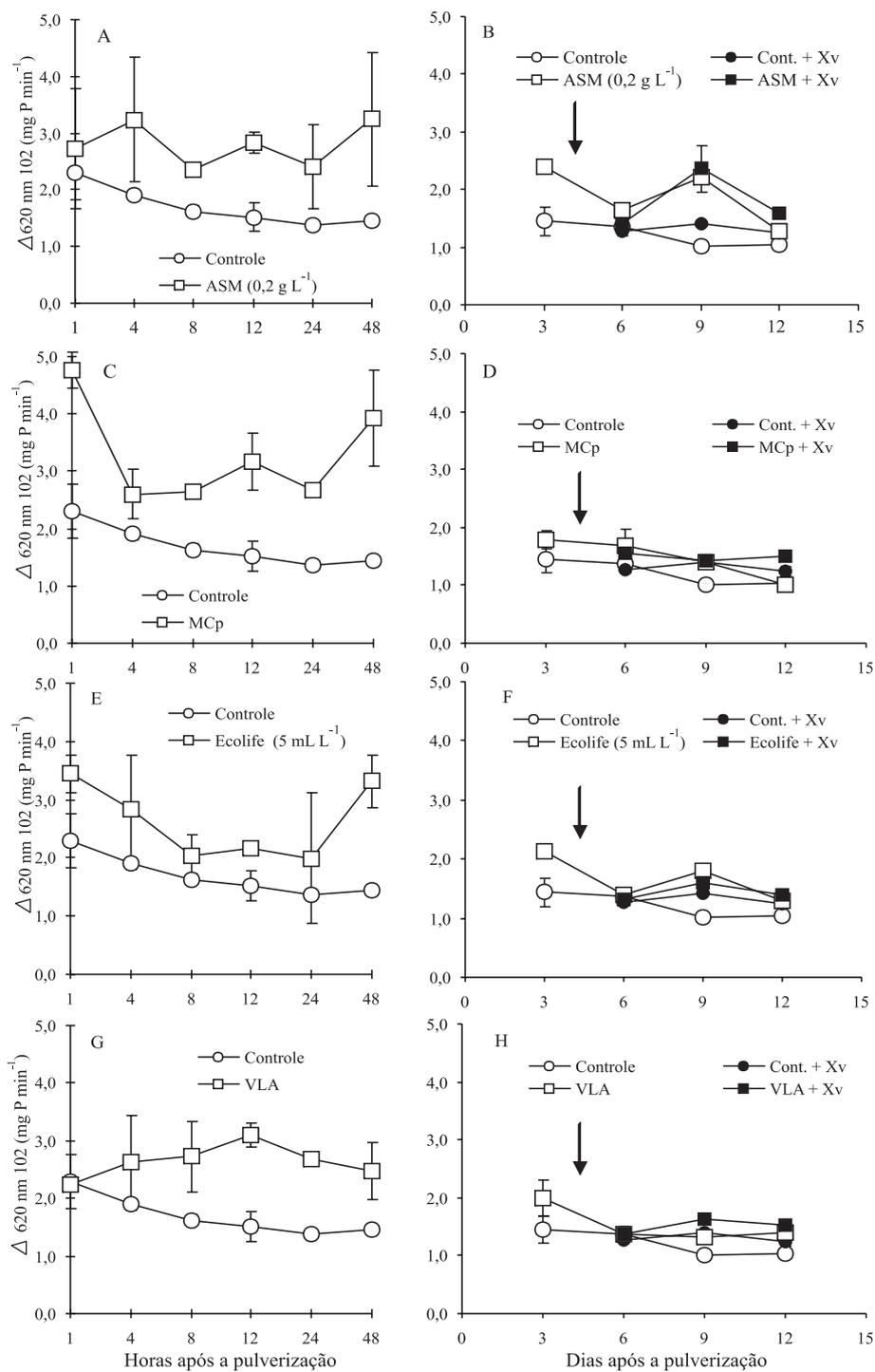


Figura 3. Atividade de beta-1,3-glucanases, em folhas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada, susceptível a *Xanthomonas vesicatoria*. Plantas foram pulverizadas 15 dias após o plantio: A e B com ASM (0,2 g L⁻¹); C e D com MCp (200 g L⁻¹); E e F com Ecolife (5 mL L⁻¹); G e H com VLA (300 g L⁻¹). Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas, e 3, 6, 9 e 12 dias após as pulverizações. Barras de erros indicam desvio-padrão da média. Setas indicam o momento da inoculação da bactéria.

redes celulares bacterianas (Schlumbaum et al., 1986; Hergert et al., 1990; Stintzi et al., 1993). Existe relato de endoquitinases com atividade lisozímica podem hidrolisar ligações β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico, e a N-acetilglucosamina no peptideoglicano da parede bacteriana (Majeau et al., 1990). No entanto, pode-se afirmar que um arsenal de defesa tenha sido eliciado depois da pulverização das plantas com as substâncias testadas.

Géis revelaram que a atividade de quitinase a partir de amostras provenientes de plantas tratadas com MCp (Figura 4) mostraram um perfil semelhante de bandas, com a revelação de seis isoformas constitutivas. O discreto aumento da densidade de zonas reveladas em gel confirma resultados das atividades colorimétricas, principalmente quando se considera as quatro bastante tênues isoformas de baixa massa molecular, que se tornam visíveis em plantas eliciadas pelas substâncias testadas. Géis com amostras provenientes de plantas pulverizadas com ASM, Ecolife e VLA revelam perfil similar de atividade lítica em gel, comparativamente à MCp, sem o aparecimento de nenhuma outra isoforma contrastante.

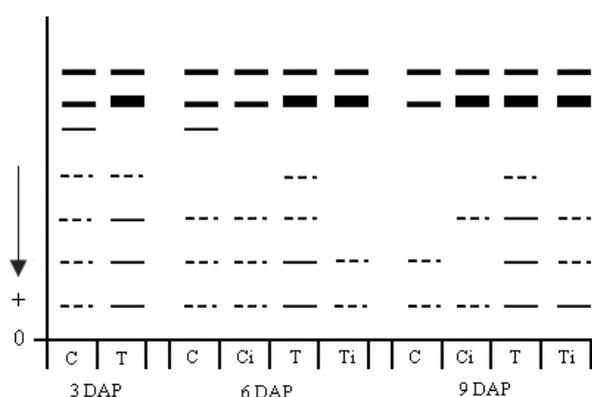


Figura 4. Representação esquemática do zimograma de quitinases, a partir de amostras de folhas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada pulverizadas com MCp, mostrando atividade forte (■), média (■), fraca (→) muito fraca (---). Os tempos foram esquematizados em 3 dias após as pulverizações (DAP) (C: controles pulverizados com água; T: plantas tratadas com a substância testada); 6 e 9 DAP (C: controles pulverizados com água; Ci: controles pulverizados com água e inoculados 4 DAP com *X. vesicatoria*; T: plantas tratadas com a substância testada; Ti: plantas tratadas com a substância testada e inoculadas 4 DAP com *X. vesicatoria*).

Conclusões

1. Acibenzolar-S-metil (ASM; 0,2 g L⁻¹), Ecolife (5 mL L⁻¹), suspensão de quitosana (MCp; 200 g L⁻¹) proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso*, e extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados por *C. pernicioso* (VLA; 300 g L⁻¹) conferem capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

2. As substâncias estudadas são capazes de promover o aumento na atividade de duas proteínas (quitinase e beta-1,3-glucanase), relacionadas à patogênese em folhas de plantas de tomateiro.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Fapemig, pelo apoio financeiro.

Referências

- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v.204, p.153-168, 1998.
- BEN-SHALON, N.; AKI, C.; ARDI, R.; PINTO, R. Elicitation effects of chitin oligomers and chitosan sprayed on the leaves of cucumber (*Cucumis sativus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Israel Journal of Plant Sciences**, v.50, p.199-206, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley, 1990. 532p.
- COLE, D. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection**, v.18, p.267-273, 1999.
- DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.185-209, 2004.
- GODARD, J.F.; ZIADI, S.; MONOT, C.; CORRE, D.L.; SILUÉ, D. Benzothiadiazole (ASM) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**, v.18, p.397-405, 1999.
- HAMMOND-KOSACK, K.E.; PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.177-193, 2003.
- HERGET, T.; SCHELL, J.; SCHREIER, P.H. Elicitor-specific induction of one member of the chitinase gene family in *Arachis hypogaea*. **Molecular and General Genetics**, v.224, p.469-476, 1990.

- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: The College of Agriculture, University of California, 1950. 32p.
- HWANG, B.K.; SUNWOO, J.Y.; KIM, Y.J.; KIM, B.S. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, p.305-322, 1997.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.96-97, 1970.
- KESSMAN, H.T.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.439-459, 1994.
- KIMURA, O.; CARMO, M.G.F. Doenças causadas por bactérias em pimentão. **Informe Agropecuário**, v.18, p.66-76, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LI, J.; ZINGEN-SELL, I.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by β -aminobutyric acid and methyl jasmonate. **Journal of Plant Diseases and Plant Protection**, v.103, p.288-299, 1996.
- LOUWS, E.J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; JONES, J.B.; SHOEMAKER, P.B.; SAHIN, F.; MILLER, S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v.85, p.481-488, 2001.
- MAJEAU, N.; TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. **Plant Science**, v.68, p.9-16, 1990.
- NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.1-7, 2002.
- OBRADOVIC, A.; JONES, J.B.; MOMOL, M.T.; BALOGH, B.; OLSON, S.M. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar application of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**, v.88, p.736-740, 2004.
- 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**, v.51, p.621-628, 2002.
- SAMY, R.P.; IGNACIMUTHU, S.; RAJA, D.P. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.235-240, 1999.
- SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). SAS language and procedures: usage. Version 8.1. Cary, 2000. 1 CD-ROM.
- SIDHU, G.S.; WEBSTER, J.M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, v.11, p.117-127, 1977.
- SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VÖGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v.324, p.365-367, 1986.
- STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v.75, p.687-706, 1993.
- SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N.A.Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v.60, p.605-610, 1997.
- TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrilamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v.178, p.362-366, 1989.
- VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.
- WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.197-205, 1990.

Recebido em 1º de novembro de 2005 e aprovado em 29 de agosto de 2006