



ADELICIO DE PAULA JORGE

**ELICITAÇÃO EM PLANTAS DE SOJA
INFECTADAS POR OÍDIO: EFEITOS DO METIL
JASMONATO E QUITOSANA EM ALGUMAS
CARACTERÍSTICAS FISIO-METABÓLICAS**

LAVRAS - MG

2016

ADELICIO DE PAULA JORGE

**ELICITAÇÃO EM PLANTAS DE SOJA INFECTADAS POR OÍDIO:
EFEITOS DO METIL JASMONATO E QUITOSANA EM ALGUMAS
CARACTERÍSTICAS FISIO-METABÓLICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Orientador

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Jorge, Adécio de Paula.

Elicitação em plantas de soja infectadas por oídio: efeitos do metil jasmonato e quitosana em algumas características fisio-metabólicas / Adécio de Paula Jorge. – Lavras : UFLA, 2016.

92 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Eliciator. 2. Octadecanóide. 3. Indução de resistência. 4. EROs. 5. Fotossíntese. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ADELICIO DE PAULA JORGE

**ELICITAÇÃO EM PLANTAS DE SOJA INFECTADAS POR OÍDIO:
EFEITOS DO METIL JASMONATO E QUITOSANA EM ALGUMAS
CARACTERÍSTICAS FISIO-METABÓLICAS**

**ELICITATION IN SOYBEAN PLANTS INFECTED BY POWDERY
MILDEW: EFFECTS OF METHYL JASMONATE AND CHITOSAN OVER
A FEW PHYSIO-METABOLIC TRAITS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de agosto de 2016.

Dr. Hudson Teixeira

EPAMIG

Profa. Dra. Ana Paula Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

IFMG

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Orientador

LAVRAS - MG

2016

A todos que de alguma forma foram essenciais para a realização deste trabalho.

OFEREÇO

A minha família, Altair, Marta e Josiane.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, auxiliar nas minhas escolhas e dar-me forças para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Altair José e Marta Vieira, pela compreensão, força e suporte. Por serem a base da minha vida, sempre acreditar e confiar nos meus sonhos.

A minha irmã, Josiane de Paula, pelo companheirismo, amizade e por sempre estar presente, aconselhando nos momentos mais difíceis.

A Lorena Gabriela, por ser meu braço direito durante todo período de mestrado. Sua amizade e companheirismo foram essenciais para todas as realizações e conquistas, serei eternamente grato.

Ao professor Amauri Alves de Alvarenga, pela orientação, incentivo, confiança, aprendizado e pelo exemplo de ética profissional.

Ao Laboratório de Fitopatologia pelo suporte concedido, em especial ao professor Mario Lúcio e o doutorando Bruno.

A professora Ana Cardoso Clemente Ferreira de Paula, e ao pesquisador Hudson Teixeira, membros da banca, pela atenção dedicada.

Aos professores e pesquisadores pelos ensinamentos e disponibilidade em ensinar e ajudar sempre que necessário.

Aos amigos do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas: João Paulo, Lorena, Paulo Cesar, Raphael, e Roniel que foram indispensáveis na realização desse trabalho, pela amizade e agradável convivência.

Aos Laboratórios de Ecofisiologia Vegetal e Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, em especial a Kamila Dázio e Dayane Meireles.

Aos funcionários do setor de Fisiologia Vegetal: Odorêncio e Joel, pela disponibilidade em auxiliar.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, por me proporcionar uma oportunidade de crescimento profissional.

Aos amigos de república pelos bons momentos de convivência.

Muito Obrigado!

RESUMO GERAL

A soja ocupa posição de destaque no agronegócio brasileiro e mundial, caracterizada por ser uma cultura de grande importância socioeconômica devido aos seus múltiplos usos. O agente patogênico *Erysiphe diffusa*, causador do oídio, caracteriza-se por ser uma doença altamente agressiva, podendo limitar de forma significativa sua produtividade. A utilização de indutores de resistência para proteção das culturas destaca-se como alternativa viável para maximizar a defesa em plantas. Dentre esses indutores, destacam-se metil jasmonato (MeJA) e a quitosana, que ativam a via dos octadecanóides, cujo o produto final é o ácido jasmônico, um fitohormônio vegetal que induz a ativação dos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos. Como eliciadores exógenos, estes podem induzir resistência à planta, aumentando as atividades de enzimas relacionadas à defesa. A fim de compreender o comportamento da indução mediada por estes eliciadores, o presente estudo busca elucidar a viabilidade do uso da quitosana, MeJA e sua interação na indução de resistência em plantas de soja, na presença da *E. diffusa*. Para tanto, avaliações bioquímicas foram realizadas, por meio da quantificação da SOD, CAT, APX, PAL, H₂O₂ e peroxidação, bem como as características ecofisiológicas (trocas gasosas e teor relativo de clorofila) e suas relações com a severidade da doença. Em casa vegetação, as plantas de soja foram infectadas naturalmente através de plantas sintomáticas e conduzidas até o estágio fenológico V5, quando receberam a aplicação dos eliciadores MeJA 1,25 mM, quitosana 3 mg/mL, a combinação MeJA/quitosana e um controle com água destilada. Aos 2, 5, 8 e 11 dias após aplicação, foram realizadas as avaliações. A severidade do oídio foi avaliada após o início da infecção. Com os dados obtidos, calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Todos os tratamentos elevaram a expressão da atividade das enzimas e dos níveis de H₂O₂, quando comparados à testemunha. Os eliciadores diminuíram a infecção, reduzindo a severidade da doença. Destaque para o efeito da interação MeJA/quitosana que retardou o aumento da doença até 15 dias após aplicação.

Palavras-chave: Eliciator. Octadecanóide. SAR. ISR. EROs. Fotossíntese.

GENERAL ABSTRACT

Soybean has a prominent position in the Brazilian and global agribusiness, characterized as a culture of great socioeconomic importance due to its multiple uses. Pathogenic agent *Erysiphe diffusa*, which causes powdery mildew, is characterized as a highly aggressive disease, and can significantly limit soybean productivity. The use of resistance inducers for culture protection is a feasible alternative for maximizing plant defense. Among these inducers, we highlight methyl jasmonate (MeJA) and chitosan, which activate the octadecanoid pathway, of which final product is jasmonic acid, a plant hormone that induces the activation of defense mechanisms against pathogen attacks. As external elicitors, they can induce plant resistance, increasing the activity of enzymes related to defense. In order to understand the behavior of induction mediated by these elicitors, this study seeks to elucidate the feasibility of using chitosan, MeJA and their interaction in inducing soybean plant resistance in the presence of *E. diffusa*. For such, biochemical evaluations were conducted by means of quantifying SOD, CAT, APX, PAL, H₂O₂ and peroxidation, as well as ecophysiological traits (gas exchange and relative content of chlorophyll) and its relations with disease severity. Under greenhouse conditions, the soybean plants were naturally infected by symptomatic plants, and conducted until the V5 phenological stage, when elicitors MeJA 1.25 mM, chitosan 3 mg/mL, MeJA/chitosan combination and a control with distilled water were applied. At 2, 5, 8 and 11 days after application, the evaluations were performed. Powdery mildew severity was evaluated after the beginning of infection. With the data obtained, we calculated the area under the disease progression curve (AUDPC). All treatments increased the expression of enzyme activity and levels of H₂O₂ when compared to the control. The elicitors decreased infection and disease severity. We highlight the effect of the MeJA/chitosan interaction, which delayed the increase of the disease in up to 15 days after application.

Keywords: Elicitor. Octadecanoid. SAR. ISR. EROs. Photosynthesis.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Cultura da Soja	13
2.2	Oídio (<i>Erysiphe diffusa</i>)	13
2.3	Indução de resistência	16
2.4	Metil Jasmonato	21
2.5	Quitosana	25
	REFERÊNCIAS	29
	CAPÍTULO 2 EFEITO SINÉRGICO DA APLICAÇÃO DE METIL JASMONATO E QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM PLANTAS DE SOJA	35
1	INTRODUÇÃO	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Condução do experimento	41
2.2	Aplicação dos produtos	41
2.3	Infecção das plantas com o fungo <i>Erysiphe diffusa</i>	42
2.4	Variáveis a serem analisadas	42
2.5	Avaliação da severidade do Oídio da soja	43
2.6	Análises enzimáticas do sistema antioxidante	44
2.6.1	Dismutase do Superóxido (SOD)	44
2.6.2	Catalase (CAT)	45
2.6.3	Peroxidase do Ascorbato (APX)	45
2.7	Análise enzimática	46
2.7.1	Fenilalanina Amônia Liase (PAL)	46
2.8	Análises não-enzimáticas	46
2.8.1	Peróxido de Hidrogênio	47
2.8.2	Peroxidação Lipídica	47
3	RESULTADOS	49
4	DISCUSSÃO	57
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	65
	CAPÍTULO 3 RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE SOJA ELICIADAS POR METIL JASMONATO E QUITOSANA INFECTADAS POR <i>Erysiphe diffusa</i>	69
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1	Condução do experimento	73

2.2	Aplicação dos produtos	73
2.3	Infecção das plantas por <i>Erysiphe diffusa</i>	74
2.4	Variáveis analisadas	74
2.5	Avaliação da severidade do Oídio da soja	75
3	RESULTADOS	77
4	DISCUSSÃO.....	85
5	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS	91

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ocupa posição de destaque no agronegócio brasileiro, caracterizando-se por ser uma cultura de grande importância socioeconômica e por seus múltiplos usos (CONAB, 2015). Entre os fatores que limitam e reduzem a produtividade, as doenças têm se destacado como um dos principais causadores, contribuindo com o aumento dos custos de produção e por promoverem reduções acentuadas na sua produtividade.

Entre as diversas doenças que afetam a cultura da soja, destaca-se o oídio, cujo agente etiológico é o fungo *Erysiphe diffusa*, o qual caracteriza-se por ser um agente patológico extremamente agressivo, podendo limitar a produção da cultura, sob condições favoráveis. O controle é realizado, principalmente, com a aplicação de fungicidas químicos, com relatos de populações de patógeno resistentes a estas moléculas, bem como de impactos negativos ao ambiente e a saúde pública (MELO et al., 2014). Diante disso, é necessário que novos métodos de controle sejam desenvolvidos, entre esses, destaca-se a utilização de indutores de resistência que atuam como indutores de respostas de defesa nas plantas.

As respostas de defesa das plantas são o resultado de uma rede complexa de eventos de sinalização que envolve a interação de quinases, hormônios e as espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva à produção de compostos de defesas para induzir resistência na planta (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016). Modificações nos componentes de sinalização podem acelerar a ativação da defesa da planta contra o ataque de patógenos, melhorando assim as respostas da planta. Essa indução de resistência pode ser melhorada pela utilização de substâncias químicas, não tóxicas, que provocam a ativação de mecanismos de defesa natural (SRIVASTAVA et al., 2011).

Dentre essas substâncias, a aplicação exógena de metil jasmonato (MeJA) e quitosana, ativa a via dos octadecanoides, sendo o produto final o ácido jasmônico, um fitohormônio vegetal que induz a ativação dos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos (SHAH et al., 2014). Essa via promove a síntese de H_2O_2 , uma das espécies reativa de oxigênio, que atua como uma molécula de sinalização (RANI e PRATYUSHA, 2013). Além disso, a aplicação exógena desses eliciadores desencadeia a ativação das enzimas antioxidantes em plantas, tais como, desmutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), e de enzimas da via do fenilpropanoide, como a fenilalanina amônia liase (PAL). A biossíntese e o acúmulo dessas enzimas conferem respostas na defesa vegetal, impedindo danos oxidativos (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016).

Nesse contexto, a aplicação de MeJA e quitosana pode ser considerada uma maneira eficiente de induzir a resistência em plantas, ao ataque de patógenos. A interação desses eliciadores constitui-se, portanto, uma forma viável de intensificar os mecanismos de defesa latentes principalmente através da ativação da via dos octadecanoides.

A fim de compreender o comportamento da indução mediada pelos eliciadores, o presente estudo buscou elucidar os mecanismos de ação da quitosana e MeJA e a sua interação na indução de resistência em plantas de soja, na presença do agente patogênico *E. diffusa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da Soja

A produção global de soja para o ano safra 2015/2016 foi projetada para 314.400.000 toneladas com aumentos significativos nos principais produtores (USDA, 2015). O Brasil é responsável por uma produção de 86.120.800 toneladas de soja em uma área cultivada de 30.173.100 hectares, sendo a maior parte exportada na forma de grãos. As condições adequadas de cultivo proporcionam aumentos graduais no rendimento desta oleaginosa, sendo esta, a espécie mais cultivada no território nacional. Em nível mundial, a soja representa a principal oleaginosa produzida e consumida, segundo dados da CONAB (2015). No Brasil, a partir dos anos 1970, a produção desta cultura passou a ter grande relevância para o agronegócio, verificada pelo aumento das áreas cultivadas e, principalmente, pelo incremento da produtividade, consequência da utilização de novas tecnologias (SILVA; LIMA; BATISTA, 2011). Entre os fatores que limitam e reduzem a produtividade da soja, estão as doenças, que contribuem com o aumento dos custos de produção e ainda são responsáveis por reduções anuais de cerca de 15 a 20% (TECNOLOGIAS, 2011). Dentre as doenças que afetam a cultura da soja, destaca-se o oídio, constatado em todas as regiões produtoras de soja no país desde a safra agrícola de 1996/1997, levando as lavouras mais afetadas a apresentarem perdas de rendimento de aproximadamente 25 a 40%, tornando-se necessárias a adoção de medidas preventivas (MELO et al., 2014; EMBRAPA 2015).

2.2 Oídio (*Erysiphe diffusa*)

Uma gama de fatores bióticos e abióticos são responsáveis por limitarem o potencial produtivo da cultura da soja. Entre esses, as doenças foliares são consideradas um dos principais, por causarem perdas consideráveis no

rendimento final e por afetarem a qualidade de grãos. O oídio da soja, cujo agente etiológico é o fungo biotrófico *Erysiphe diffusa* (BRAUN; TAKAMATSU, 2000), caracteriza-se atualmente como uma das principais doenças da cultura podendo reduzir em até 40% da produção (MELO et al., 2014). Na safra agrícola 2013/2014, 1.186 bilhões de dólares foram gastos com fungicidas na cultura da soja, principalmente para o controle desta epidemia. Apesar da eficácia de alguns fungicidas para o controle dessa doença, o uso intensivo destes produtos pode selecionar populações de patógenos resistentes, dificultando a gestão em safras consecutivas, podendo assim, ocasionar desequilíbrios biológicos e contaminação ambiental (SINDAG, 2014).

O patógeno *E. diffusa* é considerado um organismo biotrófico, que necessita de células vivas para sobreviver e se multiplicar. Portanto, sua principal forma de sobrevivência consiste nas plantas de soja remanescentes, e hospedeiros alternativos. Os danos ocasionados por este patógeno têm início quando os esporos, denominados conídios, dispersos pelo vento, são depositados sobre a superfície de um folíolo do vegetal, sendo a interação entre o patógeno e o hospedeiro responsável pelo surgimento de lesão típica da doença. O processo de infecção ocorre por meio da penetração direta através da cutícula da folha, nas células epidérmicas, onde o esporo (conídio ou ascósporo) do fungo, ao cair na superfície da folha, germina e produz uma teia de micélio que se espalha pela superfície da planta. O micélio penetra nas células epidérmicas e, através de haustórios, nutre-se do conteúdo das células. Na superfície da planta, forma-se uma fina camada de micélio e de conídios pulverulentos (IGARASHI et al., 2010).

O fungo se desenvolve em toda parte aérea da planta e a infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo mais visível no início da floração (IGARASHI et al., 2010). A planta de soja apresenta nas partes atacadas uma fina camada de micélio e esporos pulverulentos que, de pequenos

pontos brancos podem evoluir e cobrir totalmente as partes infectadas. Assim, nos casos de elevada colonização do fungo nos tecidos superficiais da planta, é possível ocorrer uma redução significativa no rendimento da soja devido à redução da área fotossinteticamente ativa em até 50% e, em casos severos, o consequente secamento e queda prematura das folhas (MIGNUCCI e BOYER, 1979; PÉREZ-VEGA, 2013).

Em relação às alterações fisiológicas no hospedeiro, Mignucci e Boyer (1979) constataram menor fotossíntese e transpiração com o aumento da infecção. Com 82% da área foliar infectada, mais da metade da atividade fotossintética da folha havia sido perdida e a transpiração reduzida a 36% em relação às plantas controle, como resultado da alteração direta na atividade metabólica induzida pelo patógeno. Para seu desenvolvimento, o fungo necessita de temperaturas em torno de 18-24°C e baixa umidade relativa do ar, não se desenvolvendo em temperaturas superiores a 30°C (GRAU, 2006). De acordo com Bedendo (2011), o conídio não germina quando um filme de água está presente na superfície da folha. Outros fatores, como época de semeadura e fase de desenvolvimento da planta, influenciam significativamente na severidade da doença, assim, algumas cultivares consideradas resistentes se tornam suscetíveis quando plantadas nas épocas mais favoráveis à ocorrência da doença (GRIGOLLI, 2014).

O oídio é dificilmente controlado por técnicas convencionais visto que o fungo produz esporos que são facilmente dispersos pelo vento. Além do mais, o fungo pode ser transmitido por resíduos vegetais e algumas ervas daninhas (PÉREZ-VEGA, 2013). Sendo assim, o controle deste fungo pode ser obtido por meio de medidas conjuntas. São recomendadas a utilização de cultivares resistentes, vistoria das lavouras e utilização de fungicidas com o aparecimento dos sintomas ou preventivamente (MELO, 2014). Apesar de eficazes, os fungicidas são de alto custo e, na maioria das vezes, são necessárias duas ou

mais aplicações, aumentando os custos de produção (VALENCIO, 2012). Diante disso, outras estratégias de controle economicamente viáveis, com boa relação custo benefício podem contribuir para o manejo de tal patógeno, essas estratégias de otimização do controle estão relacionadas ao aumento da resistência da planta, por meio da indução da ativação de mecanismos latentes, de forma preventiva, dificultando assim o desenvolvimento da doença por meio dos processos de defesa naturais das plantas.

2.3 Indução de resistência

As plantas apresentam um conjunto de mecanismos de defesa contra patógenos, que podem ser pré-existentes, ou seja, expressos constitutivamente, e outros que são induzidos como resposta de defesa ao processo de infecção. Os mecanismos pré-existentes constituem-se de barreiras físicas, como a parede celular primária, composta de celulose, hemicelulose e pectina, e a parede celular secundária, podendo estar reforçada pela deposição de lignina, impregnação de sílica, ceras, suberina e cutina (HANKS e NELSON, 2016). Outro importante mecanismo de defesa são os produtos do metabolismo primário e secundário dos vegetais. Muitos desses compostos são produzidos de forma constitutiva, sem a presença de patógenos, como é o caso de fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores proteicos e enzimas hidrolíticas (PASCHOLATI, 2010). Por outro lado, existem nos vegetais proteínas cujos genes têm sua expressão regulada por sinais liberados pelo processo de infecção, denominadas proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), que por sua vez são subdivididas em diversos grupos, tais como, β - 1,3-glucanases, quitinases e peroxidases (DE WIT, 2007).

A indução de resistência em plantas contra patógenos representa um método complementar no controle de doenças, a qual ativa seus mecanismos de defesa latentes. Essa indução pode ser ativada em plantas por uma série de

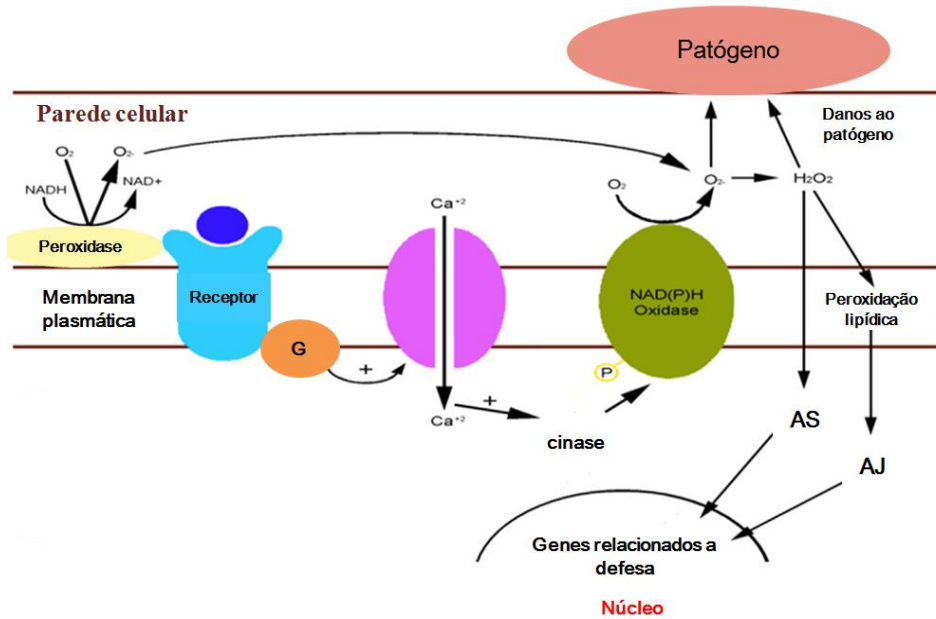
substâncias denominadas eliciadores, evitando ou atrasando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). O desempenho de um eliciador pode ser melhorado, ou estabilizado, se associado a outros indutores de resistência ou, mesmo, a micronutrientes que podem funcionar como cofatores de várias enzimas envolvidas na síntese de importantes substâncias de defesa da planta (CAVALCANTI, 2005).

Em função da rota de sinalização que leva à expressão das defesas, a indução de resistência pode ser dividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (systemic acquired resistance, SAR) que tem o ácido salicílico (AS) como o principal sinalizador, levando principalmente à expressão de PRPs (GAO, et al., 2015) e a resistência sistêmica induzida (induced systemic resistance, ISR) que atua na rota regulada pelo ácido jasmonato (AJ) e etileno (ET).

A SAR envolve a expressão de genes como das PRPs, onde a indução é dependente do AS. Essa rota de indução pode ser ativada quando a planta é exposta aos patógenos virulentos, avirulentos, não-patogênicos ou quando tratadas com ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) ou ácido-benzo-(1,2,3)-tiadiazole- 7-carbotiótico (BTH) de acordo com Pascholati et al. (2010), esta sinalização só será estabelecida após um determinado período de tempo, sendo este necessário para que ocorra a expressão de genes, acúmulo de PRPs e a indução sistêmica do AS (GAO, et al., 2015). Por outro lado, a ISR está associada ao ácido AJ e etileno ET, não envolvendo a síntese de PRPs (PASCHOLATI et al., 2010). Contudo, a resistência em plantas está associada à eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno através de mecanismos de percepção e transdução de sinais que podem resultar na resistência das plantas ao agente patogênico (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). Quando uma planta é desafiada por um patógeno ou tratada com

eliciadores, ocorrem alterações metabólicas e também um sinergismo entre o metabolismo primário e secundário (VIECELLI, 2009) (FIGURA 1).

Figura 1 - Alterações metabólicas em plantas provocadas por patógenos



Fonte: Adaptado (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016).

Legenda: G= proteína G; AS= ácido salicílico; AJ= ácido jasmônico;

Para que os mecanismos de defesa sejam induzidos é necessário que a planta reconheça o patógeno. Este reconhecimento se dá pela ligação do eliciador produzido pelo patógeno ou pela planta a um receptor presente na membrana plasmática da parede celular do vegetal (LABANCA, 2009). Estes mecanismos de reconhecimento do patógeno são considerados eventos primários e essenciais para a indução dos mecanismos de resistência (SILVA, 2008). Normalmente, o receptor é de natureza proteica e pode estar localizado tanto na membrana plasmática como no interior da célula vegetal, após esse reconhecimento, a planta passa a manifestar respostas de defesa. No entanto,

para que estas ocorram, é necessário haver sinais primários, que agiriam em cascata de sinais translocáveis e causariam a ativação de genes relacionados à defesa, tanto local como sistemicamente. A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: compatível e incompatível. Na interação compatível o patógeno invade o tecido vegetal, se multiplica e causa a doença no hospedeiro. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, encontra as defesas da planta, que são rapidamente ativadas, e impedem sua multiplicação, conferindo resistência ao hospedeiro (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016).

As plantas exibem várias respostas bioquímicas para proteção contra agentes oxidantes produzidos durante o metabolismo ou induzidos quando são submetidas a condições ambientais adversas. Em condições de estresse, como a ocasionada por patógenos, ocorre a formação de EROs, incluindo os radicais hidroxila (OH^\cdot), radicais superóxido (O_2^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são os causadores de danos oxidativos (THAKUR e SOHAL, 2013). Um aumento no nível das EROs provoca a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, diante disso, as plantas respondem a tal dano oxidativo através da produção de defesas antioxidantes que evitam danos adicionais (GILL e TUTEJA, 2010). Um agente antioxidante é uma enzima presente em baixa concentração que inibe a oxidação de biomoléculas. Os principais produzidos em resposta ao estresse incluem as enzimas SOD, CAT e APX. A SOD é uma metaloenzima que converte os radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, desse modo, atua como um inibidor de radicais superóxido. A enzima antioxidante CAT, reduz o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, a APX caracteriza-se por ser uma importante peroxidase de desintoxicação atuando na redução do superóxido em água. O peróxido de hidrogênio pode ter ação tóxica direta sobre o patógeno e está envolvido no fortalecimento celular, sendo

necessário para a biossíntese de lignina (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016).

Outras enzimas estão relacionadas à indução de defesa nas plantas, dentre elas destaca-se a PAL. Esta proteína é primeira enzima da via dos fenilpropanoides, tem sido a enzima mais estudada por estar situada em um ponto intermediário entre o metabolismo primário e secundário, catalisando a primeira etapa dessa via (KUHN e PASCHOLATI, 2010). A PAL age sobre a fenilalanina removendo o grupamento amônia e convertendo-a para ácido trans-cinâmico, formando diversos compostos fenólicos envolvidos na defesa (MANDAL et al., 2010).

Em síntese, o estímulo a mecanismos de defesa envolve reações da planta ligadas à ativação de genes de defesa, tais como, SAR, ISR, produção de lignina e enzimas hidrolíticas (ELSHARKAWY et al., 2013). As plantas comumente respondem ao eliciador ou patógeno com manifestação oxidativa, durante a qual as EROs são geradas, com consequente ativação das enzimas de membranas que desencadeiam uma reação em cascata, causando a abertura de canais de cálcio e a ativação da NAD(P)H oxidase presente na membrana plasmática. O estresse oxidativo resultante da geração de EROs, conduz ao dano celular e à morte da célula, inicialmente pelo dano no centro de reação do fotossistema II e nos lipídios de membranas (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). Além disso, respostas de defesa aos patógenos usam deliberadamente sistemas geradores de EROs baseados nas NAD(P)H oxidases e peroxidases ligadas às membranas plasmáticas (THAKUR e SOHAL, 2013). Esses sistemas são designados como destruidores de patógenos e células hospedeiras, reforçam as paredes celulares e imobilizam o patógeno dentro delas ou levam ao fenômeno de reação de hipersensibilidade (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). A reação de hipersensibilidade causa rápida morte das células no local de infecção, o que impede a expansão do patógeno (THAKUR e SOHAL, 2013).

Essas moléculas mensageiras ($O^{\cdot -2}$ e H_2O_2) são mediadoras-chave da morte celular programada de células, induzidas por patógenos em plantas, e funcionam como parte de uma rota de transdução de sinais que levam à indução de defesa ao patógeno e à morte celular (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). Além da reação de hipersensibilidade, a ativação dos genes de defesa pelas EROs induz à formação de lignina e enzimas hidrolíticas que atacam a parede celular do patógeno, como glucanases e quitinases, enzimas antioxidantes como SOD, CAT e APX.

Neste contexto, entre as medidas alternativas ao controle químico de doenças, o uso de agentes indutores de resistência e a compreensão dos fenômenos fisiológicos que ocorrem durante o processo desta indução vêm se destacando como uma forma viável de ativar os mecanismos de defesa nas plantas (ELSHARKAWY et al., 2013). Dentre os eliciadores com uso potencial contra o agente patogênico causador do oídio da soja, *E. diffusa*, encontram-se o MeJA e a quitosana, ambos podem apresentar papel importante na cascata de eventos que ocorre no processo de indução de resistência, causando efeitos benéficos contra a ação deste fungo na cultura da soja.

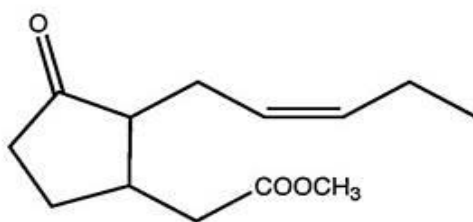
2.4 Metil Jasmonato

Com o avanço dos estudos em fisiologia vegetal tem sido atribuído a alguns fitohormônios propriedades que permitem atenuar os efeitos deletérios ocasionados pelos estresses bióticos e abióticos (KHAN et al., 2013). Dentre esses reguladores celulares, destaca-se o metil jasmonato (MeJA) (FIGURA 2), que está envolvido no controle de uma gama de processos nas plantas, tais como crescimento e desenvolvimento, além de estar relacionado à defesa contra estresses ambientais (MEHARI et al., 2015; WASTERACK, 2014).

O MeJA é o metil éster do ácido jasmônico, conhecido como jasmonato, formado por um anel de ciclopentanona com uma cadeia pentenil inserida no

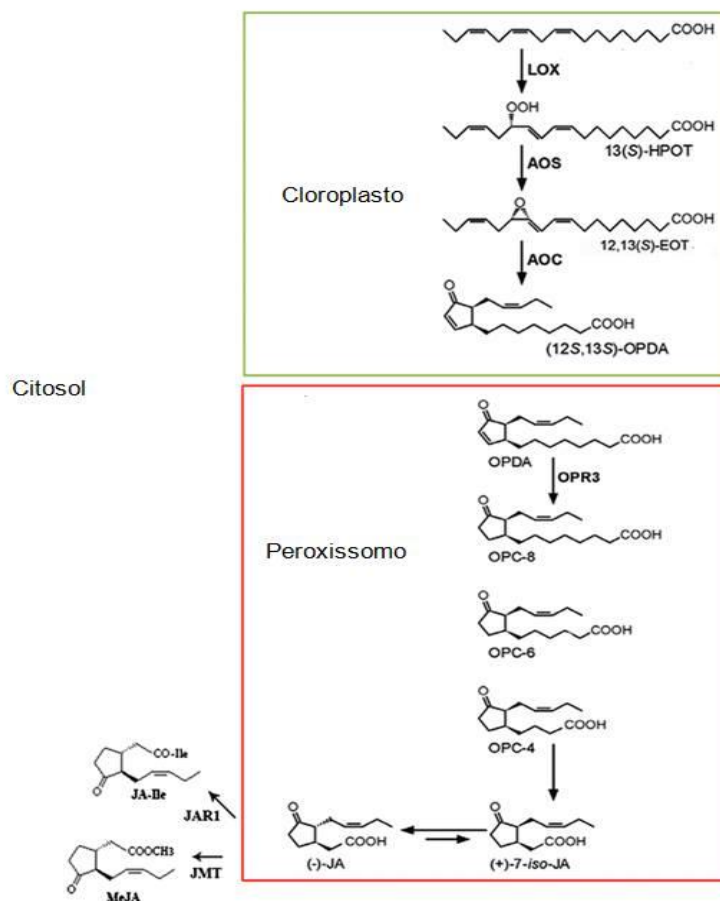
C7, um grupo carbonila no C6 e um acetyl metilado no C3 (FIGURA 3). São sintetizados a partir da liberação intracelular do ácido α linolênico (AL) a partir da estimulação de uma fosfolipase A2, sendo convertido em uma reação catalisada por uma 13-lipoxigenase (LOX), a ácido 13-hidroperóxilinoleico (13-HPOT) que é então convertido pela catalise da aleno óxido sintase (AOS) a ácido oxo-fitodienoico (OPDA) reações nas quais estão ocorrendo no cloroplasto. Estas ciclopentanonas deixam o cloroplasto e podem ser convertidas a oxo-pentenilciclopentanos (OPC), que podem agir como moléculas sinalizadoras no citosol. Os OPC são metabolizados nos peroxissomos, nos quais ocorre a redução e a β -oxidação com formação do ácido jasmônico, caracterizando assim a via dos octadecanóides (FIGURA 4). O jasmonato produzido deixa o peroxissomo e pode ser metilado no citosol para formação do MeJA e esses podem agir como moléculas sinalizadoras no citosol, ativando a transcrição de genes relacionados à defesa no núcleo, agir em células vizinhas ou serem inativados (DAR et al., 2015).

Figura 2 - Estrutura do metil jasmonato



Fonte: (DAR et al., 2015).

Figura 3 - Biossíntese do metil jasmonato, a partir da via dos octadecanóides



Fonte: Adaptado WASTERNAK, 2014.

O MeJA move-se rapidamente por toda a planta, tanto pelo xilema quanto pelo floema, provavelmente utilizando transportadores de sacarose, distribui-se mais rapidamente que os fotoassimilados e, além disso, apresenta uma alta volatilidade. Tais evidências permitem a este fitohormônio a capacidade de ser um sinalizador na ISR, uma vez que atuará como um sinal modulador da comunicação intra e entre plantas na resposta de defesa, além

disso, plantas vizinhas ainda não infectadas adquirem SAR antes da presença do patógeno (STHAL et al., 2016; WASTERACK, 2014).

Este fitohormônio ativa os mecanismos de defesa da planta em resposta aos estresses ambientais, como ferimento causado por herbívoros e patógenos especialmente os necrotróficos (MEHARI et al., 2015), bem como aos estresses abióticos, tais como baixa temperatura, seca e salinidade (DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2011).

A aplicação de MeJA desencadeia a indução da atividade das enzimas antioxidantes em plantas. Em estudos realizados com *Ricinus communis*, a aplicação de MeJA aumentou significativamente a atividade da enzima APX, o mesmo foi observado em plantas de *Zea mays*, demonstrando que a aplicação de MeJA está envolvida na resistência contra a deterioração dos tecidos através do aumento da atividade do sistema antioxidante e a sua capacidade de eliminar os radicais livres (ZANGH et al., 2016). Em outros estudos, diversos autores também relataram a ação do MeJA como um indutor do aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD (AFTAB et al., 2011; ANJUM et al., 2011); APX (PARRA-LOBATO et al., 2010, SOARES et al., 2010); CAT (MANDAL et al., 2011; AFTAB et al., 2011; ANJUM et al., 2011).

Além disso, a aplicação exógena de MeJA reduziu a peroxidação lipídica da membrana, provavelmente, devido à elevada atividade das enzimas do sistema antioxidante (AFTAB et al., 2011; ANJUM et al., 2011). Diversas enzimas da rota dos fenólicos são induzidas a serem produzidas na presença de tal composto, dentre as quais a fenilalanina amônia liase, β -1,3-glucanases e quitinases se destacam (STAHL, 2016).

Segundo AFTAB et al.(2011), as trocas gasosas são influenciadas de forma pronunciada pela presença do MeJA. Este autor observou que em artemísia, a presença deste fitorregulador melhorou a eficiência fotossintética,

expressa pela maior taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática e elevado teor de clorofila total.

Durante a interação planta-patógeno a sinalização provocada pela presença do MeJA interage tanto em sinergia como de forma antagônica com indutores que conferem a resistência adquirida, ou seja, que tem o AS como o principal sinalizador (CAARLS; PIETERSE; VAN WEES, 2015). Em estudos realizados com plantas de *Solanum lycopersicum* a resistência contra o agente patogênico *Alternaria alternata* resulta da indução de sinalização pela interação entre MeJA e quitosana (CHEN; ZOU; LIU, 2014). Nesse contexto, a interação entre MeJA e quitosana, os quais caracterizam-se por apresentarem formas distintas de indução de resistência, pode ser uma forma viável de aumentar a resistência da planta ao ataque de patógenos.

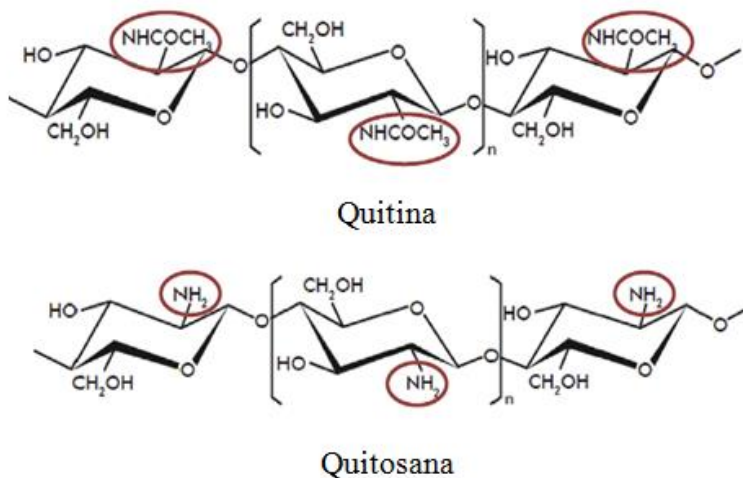
2.5 Quitosana

Quitosana, derivado da quitina, é o segundo polímero natural mais abundante no meio ambiente, sendo esse polissacarídeo amplamente distribuído em toda a natureza (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015). Por ser um material versátil, biodegradável e não tóxico, o número de aplicações da quitosana e seus derivados vem aumentando de forma constante, com ampla utilização em produtos farmacêuticos, na medicina, indústria alimentar e agricultura (CROFTON et al., 2016; CARROLL et al., 2016).

A quitosana, β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose, é um polissacarídeo linear que contém copolímeros de D-glucosamina (unidades desacetiladas) e N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas) ligadas por ligações glicosídicas β (1,4). Sua obtenção ocorre a partir da desacetilação parcial da quitina, que pode ser de natureza enzimática ou alcalina (FIGURA 4). A quitina, matéria prima da quitosana, é produzida por uma vasta gama de organismos, tais como, fungos,

algas, exoesqueletos de insetos, moluscos e crustáceos (HAMED; OZOGUL; REGENSTEIN, 2016; ABDULKARIM et al., 2013).

Figura 4 - Estruturas moleculares da quitina acetilada e quitosana desacetilada



Fonte: (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

As utilizações da quitosana na proteção de plantas a patógenos virais, bacterianos e fúngicos, vêm sendo relatadas em diversos estudos. O potente efeito deste polímero deve-se às suas propriedades antimicrobianas de ação direta ao patógeno, e sua atuação como eliciador, que ativa as defesas naturais das plantas. A atividade antimicrobiana pode ser influenciada por diversos fatores, tais como, peso molecular, solubilidade, densidade de cargas positivas, modificação química, pH, concentração, capacidade quelante e o tipo de microorganismo. Como eliciador exógeno, a quitosana, pode induzir resistência nas plantas, aumentando a atividade de várias enzimas relacionadas à defesa (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015).

A atividade antimicrobiana da quitosana pode estar relacionada à conformação de sua molécula, uma vez que, é um polímero policatiônico que

apresenta uma elevada quantidade de grupamentos amino reativos em sua estrutura, que pode ser protonado, permitindo assim, suportar cargas positivas, ao passo que a quitina, um polímero acetilado, não mostra qualquer atividade antimicrobiana. Dessa forma, o potente efeito sobre organismos patogênicos pode ser explicado pela presença de grupos amino na sua estrutura (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). Devido à presença de cargas positivas, este polímero tem elevada afinidade por lipídios de membrana, que apresentam grupamentos aniônicos expostos, bem como proteínas e glicoproteínas carregadas negativamente, formando ligações, designadas como ligações eletrostáticas (PARK et al., 2008). Essa interação com as cargas negativas da superfície da membrana aumenta a sua permeabilidade, conduzindo ao extravasamento de substâncias intracelulares, culminando na deficiência de atividades vitais do patógeno (XING et al., 2015). Em *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinérea*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Penicillium verrucosum*, essa interação eletrostática entre a quitosana e a membrana proporcionou o controle desses agentes patogênicos (PARK et al., 2008).

Por se tratar de um biopolímero, as propriedades deste composto, permitem a formação de barreiras físicas em torno dos locais de penetração dos agentes patogênicos, protegendo os tecidos adjacentes saudáveis da difusão da doença. A formação desta barreira física ocorre, pela aglutinação em torno dos locais de penetração, podendo ser feita uma analogia deste processo com o fenômeno da formação de zonas de abscisão, que é observado em folhas, o qual impede a proliferação de patógenos necrotróficos para os demais tecidos. Além da formação de barreiras físicas nos locais de penetração dos agentes patogênicos, a capacidade de quelação de nutrientes minerais exercido pela quitosana, é um aspecto limitante ao desenvolvimento dos patógenos, uma vez que, priva o acesso aos mesmos (EL HADRAMI et al., 2010).

Devido às propriedades fisiológicas e biológicas da quitosana, esta tende a estimular as respostas de defesa da planta sob o ataque de agentes patogênicos, uma vez que este polímero ativa a via dos octadecanoides, assim como o MeJA (KATIYAR et al., 2014). Como um eliciador exógeno, a quitosana pode induzir resistência à planta, aumentando as atividades de enzimas relacionadas à defesa, como PAL, APX, SOD e CAT (XING; ZHU; PENG, 2015). Essas características conferem a esse eliciador potencial de indução de resistência sistêmica adquirida (SAR), a qual proporciona defesa por períodos prolongados, a uma ampla gama de patógenos. Essa resistência pode desenvolver-se em partes não infectadas da planta, como resultado toda a planta torna-se mais resistente a infecção secundária (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015).

A partir dos relatos, a presente investigação apresenta como principal objetivo avaliar a eficiência eliciadora do MeJA e quitosana, bem como sua interação, na indução de resistência de plantas de soja ao agente patogênico Oídio da soja, *E. diffusa*.

REFERÊNCIAS

- ABDULKARIM, A, et al. Extraction and Characterisation of Chitin and Chitosan from Mussel Shell. **International Journal of Civil and Environmental Research**, Houston, v. 3, n.2, p. 2222-1719, September, 2013.
- AFTAB, T. et al. Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in *Artemisia annua* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.30, n.4, p.425-435, December, 2011.
- ANJUM, S.A. et al. Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v.10, n. 47, p.9640-9646, August, 2011.
- BRAUN, U., TAKAMATSU, S. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* and *Cystotheca*, *Podospaera*, *Sphaerotheca* inferred from rDNA ITS sequences-some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, v.4, p.1-33, August, 2000.
- BEDENDO, I.P. et al. Manual de Fitopatologia Principios e Conceitos . **Ceres**, Piracicaba, 2011. V.1, n.4, p.473-477, 2011.
- BELTRAME, A. B. **Interação Phytophthora nicotianae porta enxertos de citros (Tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular aspectos fisiológicos e bioquímicos**. 2010. 138 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- CAARLS, L.; PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. **Frontiers in Plant Science**, Chicago, v.6, n.6, p. 170-177, March 2015.
- CARROLL, E. et al. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. **Immunity**, Bermingham, v. 44, n.3 p. 597-608, March, 2016.
- CAVALCANTI, L.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. p. 263. 2005.
- CHEN, Y. ET AL. A combination of chitosan and chemical fertilizers improves growth and disease resistance in *Begonia x hiemalis* Fotsch. **Horticultural Science and Springer**, Madison, v. 57, n.1, p.1-10, February, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO –CONAB.
Acompanhamento as safra brasileira de grãos, SAFRA 2013/2014.
Observatório Agrícola. v.1, n.9, p. 1-80. Junho, 2015.

CROFTON, A, R. et al. Formulation and Characterization of a Plasma Sterilized, Pharmaceutical Grade Chitosan Powder. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 146, n.10, p.420-426, August, 2016.

DAR, T.A. et al. Jasmonates counter plant stress: A review. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 115, n. p.49-57, July, 2015.

DE WIT, P.J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Science**, Switzerland, v.64, n.21, p.2726-2732, November, 2007.

DEL AMOR, F.M.; CUADRA-CRESPO, P. Alleviation of salinity stress in broccoli using urea or methyl-jasmonate: analysis of Growth, gas Exchange, and isotope composition. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.63, n.1, p. 55-62, January, 2011.

EL HADRAMI, A. et al. Chitosan in Plant Protection. **Marine Drugys**, Switzerland, v.8, n.4, p. 968-987, March, 2010.

ELSHARKAWY, M.M. et al. Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum*. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v.29, n.2 p.193–200, Juno, 2013

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja**: região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina Embrapa Soja, 2015.

GAO, Q., et al. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, Australia, v.6, p.228-231, April, 2015.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** v.48, n.10, p.909-930. September 2010.

GRAU, C.R. **Soybean and Smal Grains**. p.1-2.Disponível em:
http://fyi.uwex.edu/fieldcroppathology/files/2010/12/powdery_mildew_06.pdf.
Acesso em: 15 Jun. 2016.

GRIGOLLI, J.F.J. Manejo de Doenças na Cultura da Soja. **Tecnologia e produção: Soja 2013/2014**. Aracaju, p.205-231, Abril, 2014.

HAMED, I., ÖZOGUL, F., REGENSTEIN, J. Industrial applications of crustacean by products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v.48, p. 40-50, February, 2016.

HANKS, T., NELSON, R. Multiple Disease Resistance in Plantas. **Annual Review of Phytopathology**, Ithaca, v.54, p.229-252, August, 2016.

IGARASHI, S. et al.. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p.245-250, Londrina, 2010.

KATIYAR, D., HEMANTARANJAN, A., SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n.1, p.1-9, February, 2015.

KHAN, M.I.R et al. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. **Plant Signaling & Behavior**, United States, v.32, n.8, p. 263-274, September, 2013.

KUHN, O.J. & PASCHOLATI, S.F.. Fitness cost of induced resistance in bean plants by the rhizobacteria *Bacillus cereus* or acibenzolar-S-methyl: enzymes activities, phenol and lignin synthesis, and biomass. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.107-114, Botucatu, 2010.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepineiro (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, p.1-118, 2009.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignin and Key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, Jenya, v.9, n.47, p.8038-8047, November 2011.

MEHARI, Z.H. Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. **Plant and soil**, The Hague, v.395, n.1, p.31-44, March 2015.

MELO, L. J. V. Crescimento e produção de fava em função de lamina de irrigação e densidade de plantio. **Revista Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 37-41, 2014.

MIGNUCCI, J., BOYER, J.S. Inhibition of Photosynthesis and Transpiration in Soybean infected by *Microsphaera diffusa*. **Physiology and Biochemistry**, Stuttgart, v.60, p.227-230, August, 1979

OLIVEIRA, M.D.M.; VARANDA, C.M.R.; FÉLIX, M.R.F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.15, p.152-158, March, 2016.

PARK, Y. et al. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Korea, v.18, n.10, p.1729-1734, June, 2008.

PARRA-LOBATO, M.C. et al. Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.66, n.1, p. 9-17, April, 2010.

PASCHOLATI, S. F.; BLUMER, S.; REZENDE, D.C.; BRAND, S. C. Indução De Resistência Novos Conceitos e Aplicações. **Anais do X Simpósio de Controle de Doenças de Plantas e V Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas**. Lavras, MG, 2010.

PÉREZ-VEGA, E. et al. Genetic mapping of two genes conferring resistance to powdery mildew in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New Delhi, v.126, n.6, p 1503-1512, June, 2013

PILLAI, C.K.S, PAUL, W., SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, Houston, v.34, n.7, p.641-678, July, 2009.

RANI, P.U., PRATYUSHA, S. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. antioxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Korean, v.16, n.2, p.131-136, June 2013

SHAH, J. et al. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. **The Plant Journal**, Hoboken, v.79, n.4, p. 645–658, August, 2014.

SILVA, R. A. de.; Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos/ Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, p.1-49, 2008

SILVA, A. C. S.; LIMA, E. P. C.; Batista, H. R. A importância da soja para o agronegócio brasileiro: Uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. Disponível em: www.apec.unesc.net. Acessado em 13 de Março de 2015.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Informações disponíveis em < www.sindag.com.br>. Acessado em 10/06/2015.

SOARES, A.M. dos et al. Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. **Brazilian Society of Plant Physiology**, Califórnia, v.22, n. 158, p. 151-158, September. 2010.

SRIVASTAVA, P. Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean: Effects on growth and development. **Crop Protection**. v.30, n.6, p.726-732. 2011.

STAHL, E., et al. Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. **Molecular plant**, Germany, v.9, p. 662-681, May 2016.

SHAH, J. et al. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. **Journal Plant**, Malden, v.79, n.4, p. 645–658, May, 2014.

TECNOLOGIAS de produção de soja – Região Central do Brasil 2012 e 2013. **Embrapa Soja. Sistemas de produção**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste . v.15, p.264. 2011.

THAKUR, M., SOHAL, B.S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **Plant Physiology**, India, p. 1–11. December, 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Disponível em: <http://www.usda.gov>. Acessado em 11 de Agosto de 2015.

VALENCIO, S.A.X. **Monitoramento da sensibilidade do fungo *Phakopsora pachyrhizi* e *Corynespora cassiicola* a fungicidas**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

VIECELLI, C. A. Controle da mancha angular e análises bioquímicas de resistência em feijoeiro tratados com extrato de *Pycnoporus sanguineus*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, vol. 34, n.2, p. 087-096, April, 2009.

WASTERNAK C. Jasmonate: na Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. **Annals of Botany**, v.100, n.4, p.681-697, May, 2014.

XING, K. et al. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Hoboken, v. 35, p. 569–588, April, 2015.

ZHANG, Y.L. Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). **Genetics and molecular research**, Ribeirão Preto, v.12, n.3, p. 3605-3621, July, 2016.

CAPÍTULO 2 EFEITO SINÉRGICO DA APLICAÇÃO DE METIL JASMONATO E QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM PLANTAS DE SOJA

RESUMO

A soja ocupa posição de destaque na economia brasileira e mundial, caracteriza-se como uma cultura de grande importância socioeconômica devido a seus múltiplos usos. O agente patogênico *Erysiphe diffusa*, causador do oídio, caracteriza-se por ser uma doença altamente agressiva, em determinadas condições, e pode limitar a produção. A utilização de indutores de resistência para proteção das plantas destaca-se como uma alternativa viável para maximizar sua defesa. Dentre esses indutores, metil jasmonato (MeJA) e quitosana, ativam a via dos octadecanóides, sendo o seu produto final o ácido jasmônico, um hormônio vegetal que induz a ativação dos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos. Como eliciadores exógenos, podem induzir resistência a planta, aumentando as atividades de enzimas relacionadas à defesa. A fim de compreender o comportamento da indução mediada pelos eliciadores, o presente estudo busca elucidar a viabilidade da ação da quitosana, MeJA e sua interação na indução de resistência em plantas de soja, infectadas por *E. diffusa*, através de avaliações bioquímicas (SOD, CAT, APX, PAL, H₂O₂ e Peroxidação) e sua relação com a severidade da doença. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo a soja infectada naturalmente através de plantas sintomáticas. As plantas foram conduzidas até estágio fenológico V5, quando receberam a aplicação de MeJA 1,25 mM, quitosana 3mg/mL, MeJA/quitosana e água destilada (controle). Após aplicação, foram realizadas 4 coletas para as avaliações (2, 5, 8 e 11 dias após aplicação). A severidade do oídio foi avaliada após o início da infecção, e a partir dos dados obtidos calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Todos os tratamentos elevaram a expressão da atividade das enzimas SOD, CAT, APX e PAL, e os níveis de H₂O₂, quando comparados à testemunha. Os tratamentos com eliciadores diminuíram a infecção do oídio atrasando a intensificação da severidade da doença. Destaca-se o efeito da interação MeJA/quitosana que retardou o aumento da infestação até 15 dias após aplicação.

Palavras-chave: Elicidor. Octadecanóide. SAR. ISR. EROs.

ABSTRACT

Soybean has a prominent position in the Brazilian and global agribusiness, characterized as a culture of great socioeconomic importance due to its multiple uses. Pathogenic agent *Erysiphe diffusa*, which causes powdery mildew, is characterized as a highly aggressive disease under certain conditions, and can limit production. The use of resistance inducers for plant protection is a feasible alternative for maximizing its defense. Among these inducers, methyl jasmonate (MeJA) and chitosan, activate the octadecanoids pathway, of which final product is jasmonic acid, a plant hormone that induces the activation of defense mechanisms against pathogen attacks. As external elicitors, they can induce plant resistance, increasing the activity of enzymes related to defense. In order to understand the behavior of induction mediated by these elicitors, this study seeks to elucidate the feasibility of the action of chitosan, MeJA and their interaction in inducing soybean plant resistance, in plants infected by *E. diffusa*, by means of biochemical evaluations (SOD, CAT, APX, PAL, H₂O₂ and peroxidation) and its relation to disease severity. The experiment was conducted in greenhouse, with the plants naturally infected by symptomatic plants. The plants were conducted to the V5 phenological stage, when elicitors MeJA 1.25 mM, chitosan 3 mg/mL, MeJA/chitosan combination and a distilled water (control) were applied. After application, four collections were conducted for evaluation (2, 5, 8 and 11 days after application). Powdery mildew severity was evaluated after the beginning of infection, and with the data obtained, we calculated the area under the disease progression curve (AUDPC). All treatments increased the activity of enzymes SOD, CAT, APX and PAL, as well as the levels of H₂O₂, when compared to the control. The treatments with elicitors decreased powdery mildew infection, delaying the intensification of the disease severity. We highlight the effect of the MeJA/chitosan interaction, which delayed the increase of infestation in up to 15 days after application.

Keywords: Elicitor. Octadecanoid. SAR. ISR. EROs.

1 INTRODUÇÃO

A soja ocupa posição de destaque na economia brasileira e mundial, pelo fato de ser uma cultura de grande importância socioeconômica, pelo seu potencial produtivo e também por seus múltiplos usos (CONAB, 2015). Entre os fatores que limitam e reduzem a produtividade da soja, as doenças têm se destacado como um dos principais causadores, contribuindo com o aumento dos custos de produção e sendo responsáveis por reduções em sua produtividade.

Dentre as doenças que afetam a cultura, o oídio da soja, cujo agente etiológico é o fungo *Erysiphe diffusa* caracteriza-se por ser uma doença altamente agressiva que pode limitar a produção da soja, em condições favoráveis. O controle desta é realizado, principalmente, com fungicidas químicos, com relatos de populações de patógeno resistentes a estas moléculas, bem como de impactos negativos ao ambiente e a saúde pública (MELO et al., 2014). Diante disso, é necessário que novos métodos de controle sejam desenvolvidos. Entre esses, destaca-se a utilização de indutores de resistência que atuam como indutores de respostas de defesa nas plantas.

As respostas de defesa das plantas é o resultado de uma rede complexa de eventos de sinalização que envolve a interação de quinases, hormônios e as espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva a produção de compostos de defesas para induzir resistência na planta (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016). Modificações nos componentes de sinalização podem acelerar a ativação da defesa da planta contra o ataque de patógenos, melhorando assim suas respostas. A indução de resistência pode ser melhorada pela utilização de substâncias químicas não tóxicas que provocam a ativação de mecanismos de defesa natural (SRIVASTAVA et al., 2011).

Dentre essas substâncias, a aplicação de metil jasmonato (MeJA), ativa a via dos octadecanoides, sendo o seu produto final o ácido jasmônico, um hormônio vegetal que induz a ativação dos mecanismos de defesa contra o

ataque de patógenos (SHAH et al., 2014). Essa via promove a síntese de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa de oxigênio (ERO), que atua como uma molécula de sinalização (RANI e PRATYUSHA, 2013). Além disso, a aplicação de MeJA desencadeia a ativação das enzimas antioxidantes em plantas, dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), assim como de enzimas da via de biossíntese de fenóis, tal como a fenilalanina amônia liase (PAL). A acumulação dessas enzimas confere respostas na defesa vegetal, impedindo danos oxidativos (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). Como este eliciador atua como um sinal que modula a comunicação intra e entre plantas na resposta de defesa, este fitohormônio permite que as plantas desenvolvam uma resistência sistêmica induzida (induced systemic resistance, ISR) (STHAL et al., 2016; WASTERACK, 2014).

Devido às propriedades fisiológicas e biológicas da quitosana, há uma tendência natural desta em estimular as respostas de defesa da planta sob o ataque de agentes patogênicos, uma vez que este polímero ativa a via dos octadecanóides, assim como o MeJA (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015). Como um eliciador exógeno, a quitosana pode induzir resistência à planta, aumentando as atividades de enzimas relacionadas à defesa, como PAL, APX, SOD e CAT (XING et al., 2015). Essas características conferem a esse eliciador potencial de indução de resistência sistêmica adquirida (systemic acquired resistance, SAR), a qual proporciona defesa por períodos prolongados, a uma ampla gama de patógenos. Essa resistência pode desenvolver-se em partes não infectadas da planta e, como resultado, toda a planta torna-se mais resistente à infecção secundária (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015).

Nesse contexto, a aplicação de MeJA e quitosana pode ser considerada uma técnica eficiente de induzir a resistência em plantas, contra o ataque de

patógenos, sendo a interação desses eliciadores uma forma viável de intensificar os mecanismos de defesa latentes principalmente através da ativação da via dos octadecanoides. A fim de compreender o comportamento da indução mediada pelos eliciadores, o presente estudo busca elucidar a viabilidade da ação da quitosana e MeJA assim como a sua interação na indução de resistência em plantas de *G. max*, na presença do agente patogênico *E. diffusa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As quantificações enzimáticas e bioquímicas foram realizadas nos Laboratórios de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas e de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia/UFLA.

Foram utilizadas plantas de soja da cultivar NA5909. Quatro sementes dessa cultivar foram semeadas em vasos plásticos contendo 5 Kg de solo peneirado e misturado com areia, na proporção 2:1, deixando-se desenvolver 3 plantas por vaso, num total de 80 vasos. As plantas foram conduzidas até o estágio fenológico V5, seguindo as recomendações tecnológicas de produção de soja (EMBRAPA, 2011).

2.2 Aplicação dos produtos

Quando as plantas atingiram estágio fenológico V5, receberam a aplicação via foliar de quatro tratamentos distintos: quitosana, MeJA, interação entre os eliciadores (MeJA/quitosana), e uma testemunha (água destilada e espalhante adesivo). Para o tratamento controle foi utilizado água destilada e polioxietileno alquilfenol éter a 0,5% (Iharaguen-s®), um espalhante foliar adesivo. O MeJA foi utilizado na concentração de 1,25 mM preparado com o mesmo espalhante adesivo, assim como a quitosana na concentração de 3 mg/mL, preparada em ácido acético 0,5% (CH_3COOH), cuja solução permaneceu sob agitação constante “overnight” (PRAPAGDEE et al., 2007). Na interação dos produtos MeJA/quitosana estes foram aplicados de maneira sequencial, sem realização de mistura prévia, onde primeiramente aplicou-se a quitosana, e logo em seguida o MeJA, com o auxílio de um pulverizador manual

tipo spray, até cobertura total das plantas. Após aplicação, todos os vasos foram cobertos com sacos plásticos transparentes por 24 h para evitar a sinalização das plantas vizinhas. As plantas submetidas ao MeJA, além de cobertas, foram levados a uma casa de vegetação distinta, com as mesmas condições de temperatura, umidade e luminosidade, por um período de 24 h, no intuito de evitar a indução dos demais tratamentos e das plantas controle, uma vez que o MeJA é conhecido por ser um fitorregulador volátil (SEO et al.,2001).

2.3 Infecção das plantas com o fungo *Erysiphe diffusa*

Utilizou-se inoculo natural proveniente de plantas de soja exibindo sintomas e sinais típicos de oídio, distribuídas uniformemente próximas às plantas teste. A introdução dos vasos contendo plantas infectadas, na casa de vegetação, ocorreu quando as plantas teste (sadias) encontravam-se no estágio fenológico V3.

2.4 Variáveis a serem analisadas

As variáveis analisadas foram: avaliação da severidade do oídio, análises enzimáticas, tais como as enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX), enzima PAL, e não-enzimáticas peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. Para a determinação da atividade específica das enzimas, foi realizada a quantificação de proteínas totais, de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 4, sendo 4 tratamentos (quitosana , MeJA, MeJa/quitsona e uma testemunha), 4 períodos de coleta, 2, 5, 8 e 11 dias após a aplicação (DAA), com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (FERREIRA, 2013). As médias entre os tratamentos foram submetidas ao teste de Scott e Knott (1974), a 0,05 de probabilidade ($p \leq 0,05$).

2.5 Avaliação da severidade do Oídio da soja

As avaliações de severidade da *E. diffusa*, foram realizadas segundo a escala diagramática de Matiazzi (2003) (FIGURA 1), tendo início quando as plantas apresentaram os primeiros sintomas da infecção, no estágio fenológico V4. Foram realizadas 9 avaliações, repetindo intervalos de 3 dias entre elas. A última avaliação ocorreu 18 dias após a aplicação dos tratamentos eliciadores. Com os dados obtidos calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) usando a equação (SHANER e FINNEY, 1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) \times 0,5] [t_{i+1} - t_i]$$

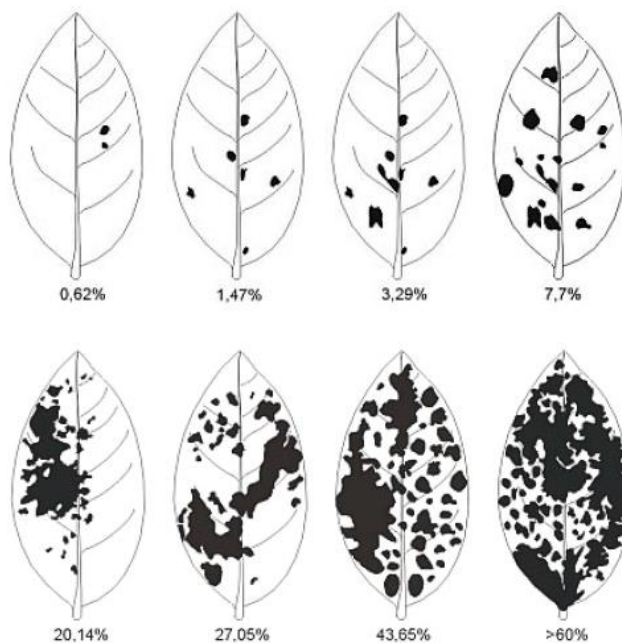
Onde:

n = número de avaliações;

y_i = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t_i = tempo no momento da i-ésima avaliação.

Figura 1 - Escala diagramática para severidade do oídio da soja, causado por *E. diffusa*.



Fonte: MATTIAZZI, 2003.

2.6 Análises enzimáticas do sistema antioxidante

O folíolo coletado para as análises foram de folhas equivalentes ao estágio fenológico V4, coletando-se um folíolo por planta, sendo as mesmas mantidas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e posteriormente armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da extração. O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de folhas, com 50% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado com 1500 μL de tampão de extração contendo tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e água (BIEMELT et al., 1998). O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e utilizado nas análises da atividade das enzimas SOD, CAT e APX.

2.6.1 Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Alíquotas do extrato enzimático foram adicionadas ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μ M, água, NBT 75 μ M e riboflavina 2 μ M. As placas com o meio de reação e as amostras foram iluminadas, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O teste em branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da atividade da enzima seguindo a equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

2.6.2 Catalase (CAT)

Utilizou-se a metodologia proposta por Havir e McHale (1987), em que alíquotas do extrato enzimático foram adicionadas ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), água e peróxido de hidrogênio 12,5 mM. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota do extrato enzimático adicionada ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM, água e peróxido de hidrogênio 0,1 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7 Análise enzimática

Para quantificação da atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), foram macerados 0,3 g de folha em nitrogênio líquido, homogeneizado em 1500 μL do tampão de extração, composto por fosfato de potássio 100 mM e 2 mercaptoetanol 10 mM, e centrifugado a 15000 g por 15 minutos a 4°C, para posterior avaliação.

2.7.1 Fenilalanina amônia liase (PAL)

A atividade da PAL foi avaliada segundo Mori et al., (2001), a partir da coleta de folíolos equivalentes ao estágio fenológico V4, sendo utilizado uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático e adicionado 150 μL de um meio de incubação. O meio de incubação foi composto por 100 μL de tampão Tris-HCL pH 8,8 a 100 mM e 50 μL de fenilalanina a 40 mM. A incubação foi realizada em placas de acrílico a 37°C por 30 min no aparelho espectrofotômetro Elisa (POWER WAVV XS DA BIOTEK) a 280 nm, sendo que as leituras foram realizadas a cada 10 minutos. A atividade da PAL foi expressa em $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de 10 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (ZUCKER, 1965).

2.8 Análises não-enzimáticas

Tanto para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) quanto para a quantificação da peroxidação lipídica, foram macerados 0,2 g de folha em nitrogênio líquido, homogeneizado em 1500 μL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C, para posterior avaliação.

2.8.1 Peróxido de hidrogênio

Foram macerados 200 mg de massa fresca em nitrogênio líquido, homogeneizados em 1500 μL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4° C. A reação foi iniciada pela adição de uma alíquota da amostra ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e iodeto de potássio 1M. O H_2O_2 foi determinado medindo-se a absorvância a 390 nm e com base em uma curva padrão com concentrações conhecidas de H_2O_2 (VELIKOVA et al., 2000).

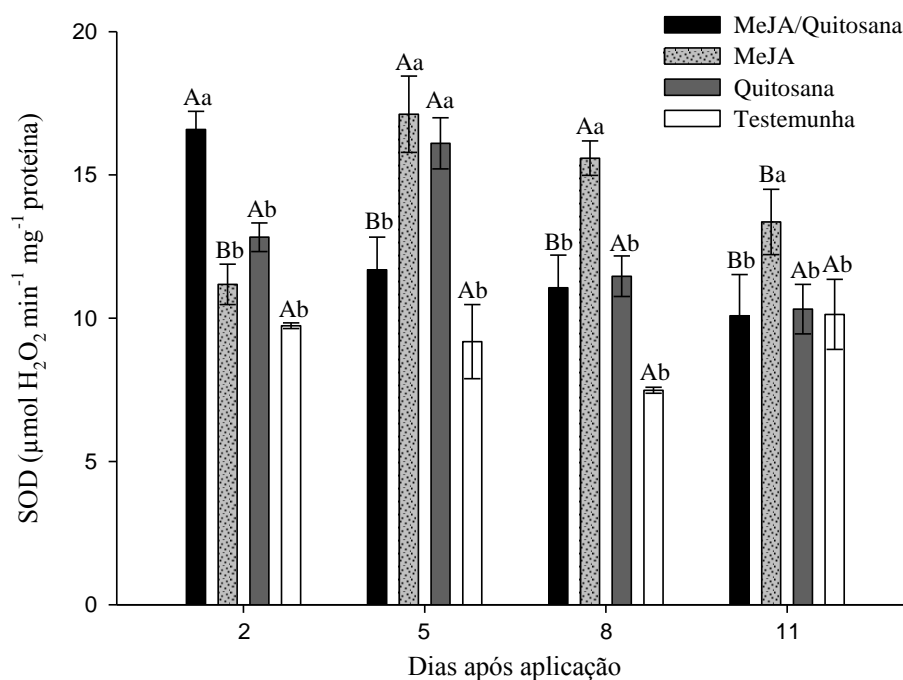
2.8.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Cem miligramas de massa fresca foram macerados em N_2 líquido e homogeneizados em 1500 μL de TCA 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos e alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% de TCA, incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas no aparelho espectrofotômetro Elisa (POWER WAVV XS DA BIOTEK), a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (\text{A}_{535} - \text{A}_{600})/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g^{-1} de proteína.

3 RESULTADOS

Todos os tratamentos elevaram a expressão da atividade da enzima SOD, em relação à testemunha. A interação MeJA/quitosana atingiu os maiores índices 2 dias após aplicação (DAA), sendo o comportamento semelhante ao observado na quitosana, 5 DAA. Contudo, o tratamento com MeJA conferiu máxima atividade 5 DAA, decaindo até 11 dias, porém manteve-se superior aos demais tratamentos (FIGURA 2).

Figura 2 - Atividade da dismutase do superóxido (SOD), nas folhas de plantas de soja, submetidas a diferentes tratamentos com eliciadores

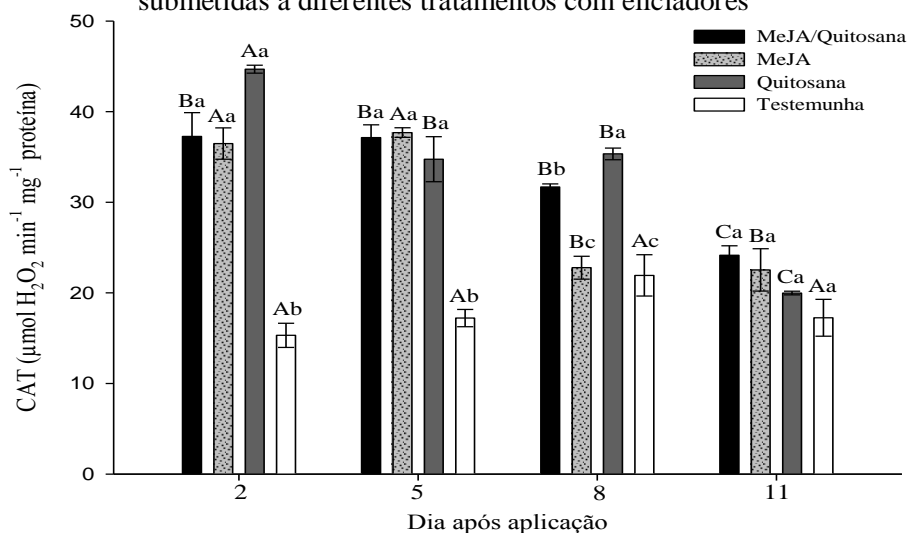


Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Em relação à CAT, verifica-se que todos os tratamentos elevaram a sua atividade, entretanto, os eliciadores que conferiram respostas mais duradouras foram os tratamentos com quitosana aplicada isoladamente, e sua interação com MeJA, causando uma redução de sua atividade aos 11 DAA. O tratamento com MeJA conferiu elevada atividade até o quinto dia após aplicação (FIGURA 3).

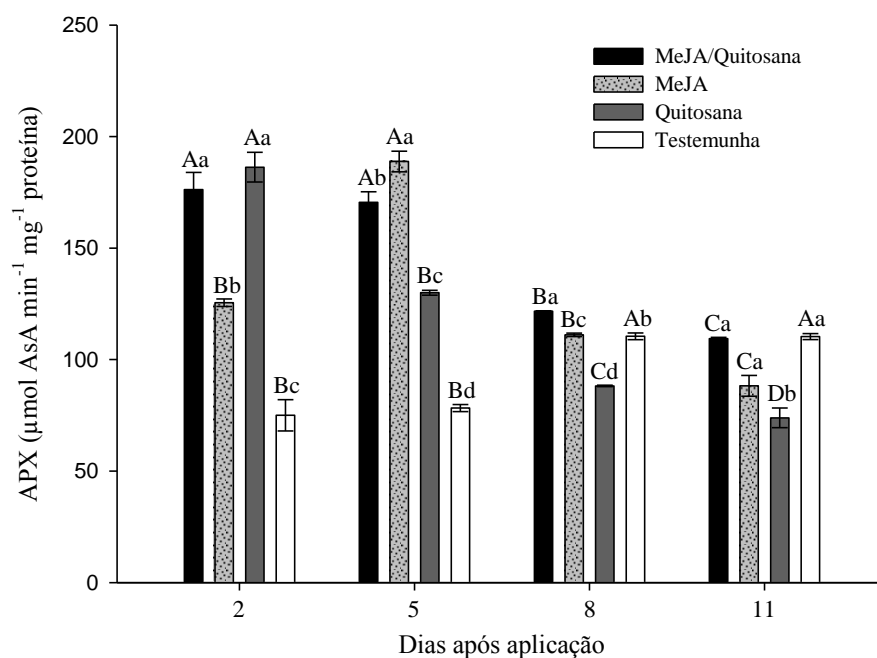
Corroborando com os resultados obtidos na atividade das enzimas SOD e CAT, observou-se que para APX, a aplicação dos tratamentos elevou sua atividade, em relação à testemunha; entretanto, com efeito menos duradouro. A intensificação mais pronunciada da atividade enzimática deu-se pela aplicação da interação MeJA/quitosana, e quitosana isoladamente, 2 DAA. No quinto dia após aplicação a os valores da interação ainda mostrou-se pronunciada, sendo inferior apenas ao tratamento com MeJA (FIGURA 4).

Figura 3 - Atividade da enzima catalase (CAT), em folhas de plantas de soja, submetidas a diferentes tratamentos com eliciadores



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

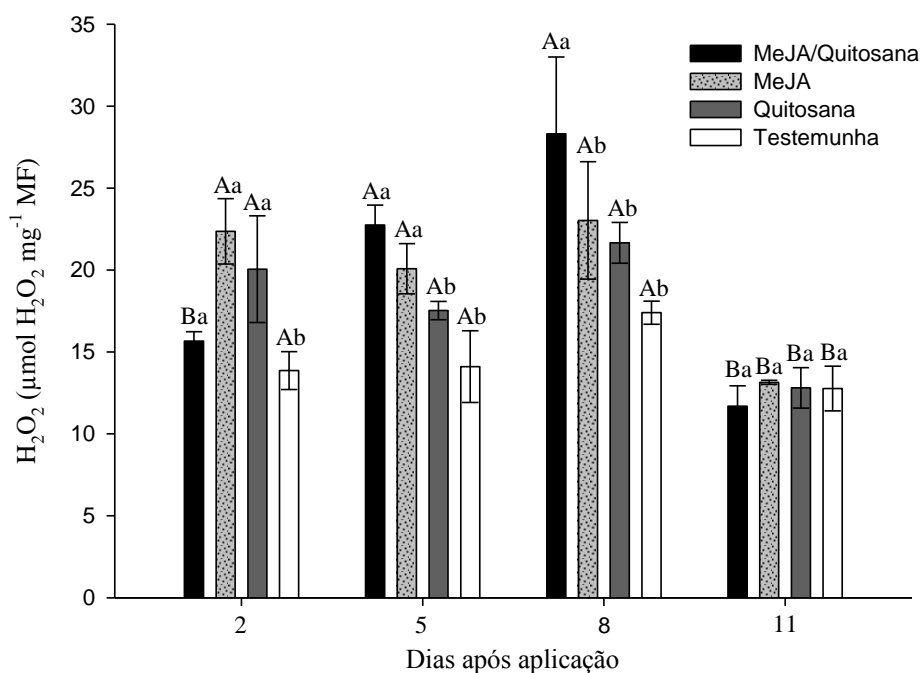
Figura 4 - Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), em folhas de plantas de soja, submetidas a diferentes tratamentos com eliciadores



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Todos os tratamentos proporcionaram elevação nos níveis H_2O_2 , em relação a testemunha. A interação MeJA/quitosana proporcionou um acúmulo de H_2O_2 com início tardio, sendo valor máximo observado 8 DAA, enquanto os menores níveis de H_2O_2 foram atingidos no último período de avaliação (FIGURA 5).

Figura 5 - Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas de plantas de soja, submetidas a diferentes tratamentos com eliciadores



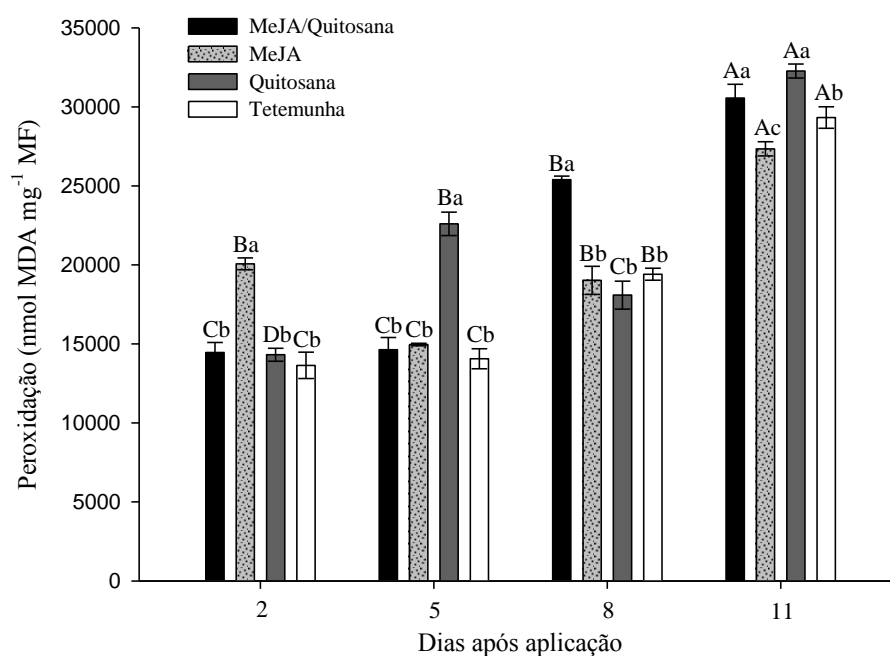
Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os níveis de peroxidação lipídica foram expressos em conteúdo de malonaldeído (MDA), sendo que, os mesmos elevaram gradativamente com o decorrer dos períodos de avaliação. O tratamento com MeJA garantiu os menores níveis de peroxidação na última avaliação, comportando-se de forma semelhante à testemunha (FIGURA 6).

Com relação à influência dos eliciadores no metabolismo fenólico, pode ser observado que a atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) nas plantas eliciadas, foi influenciada pelos tratamentos. A interação MeJA/quitosana

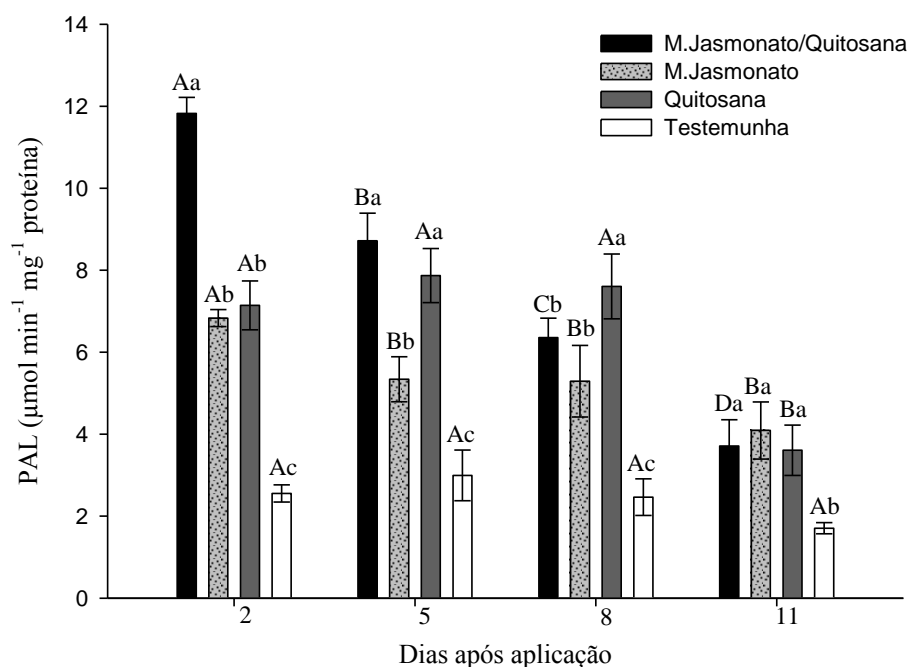
proporcionou a atividade mais elevada entre os tratamentos, 2 DAA. A quitosana conferiu alta atividade por um período maior de tempo, decaindo 11 DAA. Na última avaliação, os tratamentos apresentaram valores semelhantes, contudo superiores à testemunha (FIGURA 7).

Figura 6 - Níveis de peroxidação lipídica expresso pelo conteúdo de malondialdeído (MDA), em folhas de plantas de soja, submetidas a diferentes tratamentos com eliciadores



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

Figura 7 - Atividade da enzima Fenilalanina amônia liase (PAL), em folhas de plantas de soja, submetidas a diferentes tratamentos com eliciadores

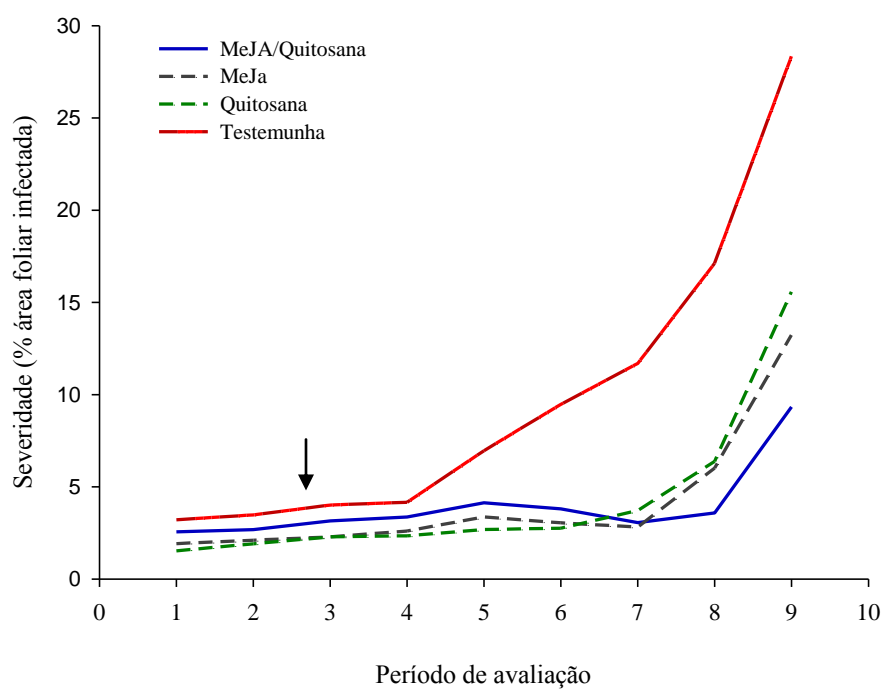


Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

O tratamento que conferiu menor severidade da doença causada pela *E. diffusa*, foi a interação MeJA/quitossana, onde foi possível observar intensificação da infestação, na oitava avaliação, ou seja, 15 dias após aplicação dos tratamentos. Resultados semelhantes podem ser observados quando MeJA e quitossana foram aplicados de forma isolada, entretanto esses suprimiram a infestação apenas até a sétima avaliação, seguida de uma rápida elevação da severidade. Ao compararmos com a testemunha, esse aumento da severidade, deu-se na quarta avaliação, apresentando elevação linear em função do tempo. A menor severidade atingida pelos tratamentos podem ser observadas, quando se

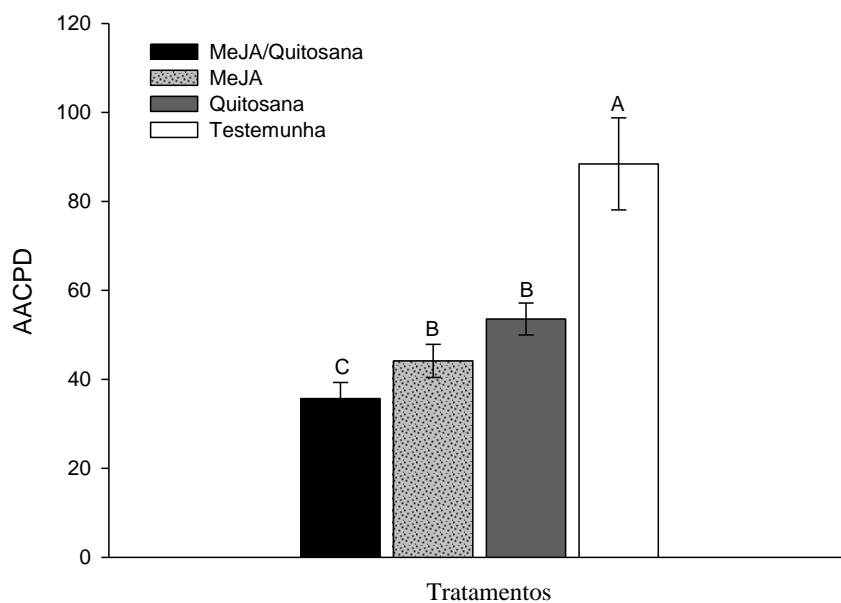
avalia a AACDP, os menores índices foram obtidos pela interação MeJa/quitosana, seguida pela aplicação individual dos eliciadores (FIGURAS 8 e 9).

Figura 8 - Curvas de progresso da *E. diffusa* em plantas de soja, expresso em porcentagem de área foliar lesionada em função do tratamento eliciador e o período de avaliação



Legenda: A seta representa o momento da aplicação dos tratamentos eliciadores, no estágio fenológico V5.

Figura 9 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para severidade de *E. diffusa*, em plantas de soja submetidas a aplicação de eliciadores



Legenda: Letras diferentes indicam variação estatística entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a interação entre MeJA/quitosana poderá resultar em maior resistência ao patógeno oídio em plantas de soja devido ao aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e do metabolismo fenólico, sendo esses considerados importantes para a proteção da planta aos ataques de patógenos, atuando assim como minimizadores dos danos oxidativos.

A enzima antioxidante SOD é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 , desempenhando um papel central na defesa contra o estresse oxidativo (FORTUNATO et al., 2015). A enzima APX é um componente central do ciclo ascorbato-glutationa e apresenta um papel essencial no controle dos níveis intracelulares de EROs, catalisando a redução do H_2O_2 à água. Esta enzima é considerada como uma das enzimas antioxidantes mais amplamente distribuídas em células de plantas, e com a maior afinidade e especificidade para o H_2O_2 em relação a CAT que é considerada uma eliminadora eficiente de EROs, sob condições adversas tais como ataque de patógenos (FOYER e NOCTOR 2011; SHARMA et al., 2012).

Ao analisar a atividade dessas enzimas sob as condições que as plantas de soja foram expostas, observou-se que a interação entre MeJA/quitosana proporcionou um aumento inicial da resposta das enzimas analisadas na presença do agente patogênico oídio, sendo que os demais tratamentos impostos de forma isolada, também proporcionaram elevações na atividade dessas enzimas. Este aumento é frequentemente correlacionado com uma maior tolerância das plantas ao ataque de patógenos, uma vez que essas enzimas são capazes de estabilizar as membranas, diminuindo a sua fluidez, o que acarretaria uma redução na mobilidade dos radicais livres na bicamada lipídica, resultando inibição da peroxidação lipídica devido a um abrandamento nas reações desses radicais, diminuindo assim os danos oxidativos ocasionados pela presença do

agente patogênico (FOYER e NOCTOR, 2011; DEBONA et al., 2012). Resultados semelhantes foram obtidos em aplicações de quitosana, MeJA e sua interação em plantas contra o ataque de patógenos (ZENG; LUI, 2012; FORTUNATO et al., 2015; DOM et al., 2013).

A via do fenilpropanóide caracteriza-se, como uma importante via do metabolismo secundário em plantas, pelo fato de ser responsável pela produção de uma variedade de compostos fenólicos com funções estruturais, assim como de defesa. A PAL é uma enzima chave desta via e está diretamente envolvida na síntese de fenois, fitoalexinas e lignina, compostos estes associados com os processos de resistência (DOM et al., 2013). No presente estudo, esta enzima apresentou um aumento inicial de sua atividade, quando as plantas de soja foram expostas ao tratamento conjunto de MeJA/quitosana. Essa resposta se deve ao fato de que a quitosana, apresenta elevado potencial de ativação de genes relacionados à defesa através da via dos octadecanoides, diretamente relacionado à síntese de MeJA. Sendo assim, a interação entre ambos os elicadores conduz a um efeito sinérgico, aumentando as respostas de defesa contra o oídio. Corroborando com estudos realizados com plantas de *Solanum lycopersicum*, expostas a ao fungo *Alternaria alternata*, e sinalizadas pela interação entre ambos os eliciadores, observou-se um aumento da atividade desta enzima. Ao analisar a indução da atividade desta enzima, quando as plantas foram expostas aos tratamentos isoladamente, observou-se que estes proporcionaram uma intensificação da atividade desta enzima, uma vez que quitosana assim como MeJA são ativadores das rotas de defesa. Respostas similares foram obtidas em estudos realizados com *Musa spp.*, *Begonia hiemalis*, na presença dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, respectivamente (DOM et al., 2013; CHEN et al., 2016).

O H_2O_2 caracteriza-se por apresentar dupla função, como sinalizador oxidativo e como agente de estresse oxidativo. Estas respostas diretamente

relacionadas a proporção de peróxido presente, ou seja, este tende a estar envolvido nas fases iniciais da resposta de resistência das plantas e pode ser induzido por uma variedade de eliciadores. Assim, a acumulação desta ERO é reconhecida como um sinal que ativa outras reações de defesa. Na presente investigação, o nível de H_2O_2 sofreu uma elevação seguida de uma queda no último dia de análise, sendo que os eliciadores, em todas as suas formas de aplicação, proporcionaram uma influência significativa nos resultados. Efeitos semelhantes foram relatados quando plantas de *S. lycopersicum* foram infectadas com *B. cinerea*, onde foi observada uma rápida elevação dos níveis de H_2O_2 induzida pela aplicação de MeJA. A aplicação de quitosana promoveu resultados semelhantes em plantas de *G. max* reduzindo a gravidade da doença causada por *B. cinerea*, assim como através da interação entre estes eliciadores aplicados em *S. lycopersicum* infectadas por *A. alternata* (XING; ZHU; PENG, 2015; CHEN et al., 2014).

Malonaldeído (MDA), um produto da decomposição de ácidos graxos poliinsaturados, é reconhecido como um indicador da peroxidação lipídica. Um aumento da concentração deste sugere que as plantas estão sob condição de estresse oxidativo, o que poderá resultar em lesões na membrana, assim como a necrose do tecido (DEBONA et al., 2012). No presente estudo realizado, o teor de MDA sofreu aumento ao longo dos dias após a aplicação dos eliciadores, sendo que os tratamentos apresentaram um efeito benéfico na presente situação. Em plantas expostas a eliciadores, observou-se que estes tendem a alterar a porcentagem de ácidos graxos nas membranas de tecidos das plantas, reduzindo assim a chance destas serem alvo de radicais livres (DOM et al., 2013). O notável aumento da atividade das enzimas antioxidantes analisadas, SOD, CAT, APX, assim como da enzima PAL, quando as plantas de soja foram submetidas à eliciadores, apresentaram uma relação com o nível de peroxidação lipídica, provavelmente esses resultados condizem com a atuação das enzimas de manter

as funções fisiológicas normais, quando as plantas estão sob o ataque de patógenos. Desta maneira, os resultados obtidos mostram que o sistema antioxidante desempenhou um papel central na proteção das células das plantas contra os danos oxidativos provocados pelo oídio, e os eliciadores aplicados, apresentaram um efeito benéfico na indução de resistência. Assemelhando-se aos resultados obtidos quando plantas de *G. max*, *Musa spp.* e *S. lycopersicum* foram expostas a condições similares, onde foi observado um retardamento da síntese de MDA por aplicação de MeJA, quitosana e sua interação (AFTAB et al., 2010; DOM et al., 2013).

A quitosana é um polímero policatiônico com elevada quantidade de grupamentos amino reativos em sua estrutura é capaz de ser protonado e assim carregar cargas positivas. Tais características credenciam-no a reprimir o desenvolvimento de agentes patogênicos, através da inibição da germinação dos esporos e do desenvolvimento do tubo germinativo, retardando o processo de infecção. A presença dessas cargas confere elevada afinidade por lipídios de membrana, que apresentam grupamentos aniônicos expostos, bem como proteínas e glicoproteínas carregadas negativamente, formando ligações, designadas como ligações eletrostáticas (PARK et al., 2008). Essa interação com as cargas negativas da superfície da membrana aumenta a sua permeabilidade, conduzindo ao extravasamento de substâncias intracelulares, culminando na deficiência de atividades vitais do patógeno (XING; ZHU; PENG, 2015). Em *Aspergillus fumigatus*, *B. cinerea*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Penicillium verrucosum*, essa interação eletrostática entre a quitosana e a membrana proporcionou o controle desses agentes patogênicos (PARK et al., 2008).

Sendo *E. diffusa* um patógeno biotrófico, os resultados obtidos por meio da análise de severidade, condiz com o comportamento observado por meio das análises enzimáticas e não enzimáticas. A aplicação sequencial de

MeJA/quitosana, provoca uma resposta de defesa viável contra o oídio em plantas de *G. max*, podendo este comportamento estar associado a elevação das atividades de defesa da planta, e ainda ao efeito direto da quitosana na inibição da germinação e desenvolvimento dos esporos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o elevado potencial do MeJA e quitosana em induzir a ativação das principais enzimas do sistema antioxidante e da biossíntese de fenóis. Destaque para o efeito sinérgico entre eles, uma vez que a aplicação combinada dos eliciadores provocou um atraso na infecção por oídio em plantas de soja.

REFERÊNCIAS

- AFTAB, T. et al. Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in *Artemisia annua* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.30, n.4, p.425-435, December, 2011.
- BIEMELT, S. et al. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BRADFORD, M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochemistry**, v.72 p.248-254, 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p.302-310, 1978.
- CHEN, Y. ET AL. A combination of chitosan and chemical fertilizers improves growth and disease resistance in *Begonia x hiemalis* Fotsch. **Horticultural Science and Springer**, Madison, v. 57, n.1, p.1-10, February, 2016.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO –CONAB.
Acompanhamento as safra brasileira de grãos, SAFRA 2013/2014.
Observatório Agrícola. V.1, n.9, p. 1-80. Junho 2015.
- DEBONA, D. ET AL. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Davis, v.102, n.12, p. 1121-1129, December, 2012.
- DELANO-FRIER, J.P. Systemic wound signaling in plants, **Long-distance systemic signaling and communication in plants**. Rockville, v.19, n.5, p. 323-362, April, 2013
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja** : região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6. 2013.

FORTUNATO, A.A. et al. Changes in the antioxidant system in Soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. **Biochemistry and Cell Biology**, Davi, v.105, n.8, p.1050-1058, August, 2015

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox. **Plant Physiology**, Rockville, v.155, p.2-18, 2011.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxido dismutases: I. ocorrência em higher plants. **Plant Physiology**, Rocheville, v.59, n.2, p. 309-314, 1977.

HAVIR, E.A.; MC HALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rocheville, v.84, n.2, p.450-455, 1987.

KATIYAR, D., HEMANTARANJAN, A., SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n.1, p.1-9, February, 2015.

MATTIAZZI, P. **Efeito do oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja**. 2003. Dissertação (Mestrado)—Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

MELO, L. J. V et al. Crescimento e produção de fava em função de lâminas de irrigação e densidade de plantio. **Revista Tecnologia e Ciência Agropecuária**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 37-41, 2014.

MINOLTA CAMERA LTDA. **Manual for chlorophyll meter spad 502**. Osaka: Radiometric Instruments Division, p.22, 1989.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n.5, p. 867-880, 1981.

OLIVEIRA, M.D.M.; VARANDA, C.M.R.; FÉLIX, M.R.F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.15, p.152-158, March, 2016.

PRAPAGDEE, B. et al., The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* F. SP. *Glycines*. **bioresour. Technology**, San Diego, v.98, p.1353-1358, 2007.

PARK, Y. et al. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Korea, v.18, n.10, p.1729-1734, June, 2008.

RANI, P.U., PRATYUSHA, S. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. antioxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Korean, v.16, n.2, p.131–136, June 2013

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SHAH, J. et al. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. **The Plant Journal**, Hoboken, v.79, n.4, p. 645–658, August, 2014.

SRIVASTAVA, P. Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean: Effects on growth and development. **Crop Protection**. v.30, n.6, p.726-732. 2011.

STAHL, E., et al. Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. **Molecular plant**, Germany, v.9, p. 662-681, May 2016.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

XING, K. et al. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, France, v. 35, p. 569–588, April, 2015.

ZENG, K.F., et al. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by hitosan. **Science Horticultural**, The Netherlands, v.126, n.2 p. 223-228, September, 2012.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by lighth and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant physiology**. Rockville, v.40, n.5, p. 779-784. September 1965.

CAPITULO 3 RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE SOJA ELICIADAS POR METIL JASMONATO E QUITOSANA INFECTADAS POR *ERYSIPHE DIFFUSA*

RESUMO

A soja ocupa posição de destaque na economia brasileira e mundial, caracteriza-se como uma cultura de grande importância socioeconômica devido a seus múltiplos usos. O agente patogênico *Erysiphe diffusa*, causador do oídio na cultura da soja, caracteriza-se por ser uma doença altamente agressiva, e pode limitar sua produção. A utilização de indutores de resistência para proteção das culturas destaca-se como uma alternativa viável para maximizar a defesa das plantas. Metil jasmonato (MeJA) e quitosana, apresentam potencial uso como indutores de resistência por meio de sua ação eliciadora. Estes que regulam as trocas gasosas, causando alterações na atividade fotossintética. A fim de compreender o comportamento da indução mediada pelos eliciadores, o presente estudo busca elucidar a viabilidade da ação da quitosana e MeJA assim como a sua interação na indução de resistência em plantas de soja, infeccionadas por *E. diffusa*, através de avaliações ecofisiológicas (fotossíntese, transpiração e condutância estomática), teores relativos de clorofila e sua relação com a severidade da doença. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo a soja infectada naturalmente por meio do contato com plantas sintomáticas. As plantas foram conduzidas até estágio fenológico V5, quando receberam aplicação dos tratamentos eliciadores (MeJA 1,25 mM, quitosana 3 mg/mL, MeJA/quitosana e controle com água destilada). Após aplicação, foram feitas 4 coletas para as avaliações (2, 5, 8 e 11 dias após aplicação). A severidade do oídio foi avaliada após o início da infecção, com os dados obtidos calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Os tratamentos causaram alterações nas trocas gasosas, mas mantiveram os teores de clorofila. Essas alterações diminuíram o potencial de infecção do oídio atrasando a intensificação da severidade da doença. Destaca-se o efeito da interação MeJA/quitosana que retardou o aumento da infestação até 15 dias após aplicação.

Palavras-chave: Trocas gasosas. Fotossíntese. Indução de resistência. eliciadores.

ABSTRACT

Soybean has a prominent position in the Brazilian and global agribusiness, characterized as a culture of great socioeconomic importance due to its multiple uses. Pathogenic agent *Erysiphe diffusa*, which causes powdery mildew in soybean culture, is characterized as a highly aggressive disease, and can limit its production. The use of resistance inducers for culture protection is a feasible alternative for maximizing plant defense. Methyl jasmonate (MeJA) and chitosan have the potential for use as resistance inducers by their eliciting action. They regulate gas exchange, causing changes in photosynthetic activity. In order to understand the behavior of induction mediated by these elicitors, this study seeks to elucidate the feasibility of using chitosan, MeJA and their interaction in inducing soybean plant resistance, in plants infected by *E. diffusa*, by means of ecophysiological evaluations (photosynthesis, transpiration and stomata conductance), relative contents of chlorophyll and its relation with disease severity. The experiment was conducted in greenhouse, where the soybean plants were naturally infected by symptomatic plants. The plants were conducted to the V5 phenological stage, when they received the treatments with the elicitors (MeJA 1.25 mM, chitosan 3 mg/mL, MeJA/chitosan combination and a control with distilled water). After the application, four collections (2, 5, 8 and 11 days after application) were performed for the evaluations. Powdery mildew severity was evaluated after the beginning of infection, and with the data obtained, we calculated the area under the disease progression curve (AUDPC). The treatments caused changes in gas exchange, but maintained the contents of chlorophyll. These changes decreased the potential of infection by powdery mildew, delaying the intensification of disease severity. We highlight the effect of the MeJA/chitosan interaction, which delayed the increase of the disease in up to 15 days after application.

Keywords: Gas exchange. Photosynthesis. Resistance induction. Elicitors.

1 INTRODUÇÃO

A soja ocupa posição de destaque na economia brasileira e mundial, pelo fato de ser uma cultura de grande importância socioeconômica, pelo seu potencial produtivo e também por seus múltiplos usos (CONAB, 2015). Entre os fatores que limitam e reduzem a produtividade da soja, as doenças têm se destacado como um dos principais causadores, contribuindo com o aumento dos custos de produção e sendo responsáveis por reduções em sua produtividade.

Dentre as doenças que afetam a cultura, o oídio da soja, cujo agente etiológico é o fungo *Erysiphe diffusa* caracteriza-se por ser uma doença altamente agressiva que pode limitar a produção da soja, em condições de clima favorável. O controle desta é realizado, principalmente, com fungicidas químicos, com relatos de populações de patógeno resistentes a estas moléculas, bem como de impactos negativos ao ambiente e a saúde pública, diante disso, é necessário que novos métodos de controle sejam desenvolvidos (MELO et al., 2014). Entre esses, destaca-se a utilização de indutores de resistência que atuam como indutores de respostas de defesa nas plantas.

Metil jasmonato (MeJA) e quitosana apresentam uso potencial como indutores de resistência por meio de sua ação eliciadora. Estes podem regular as trocas gasosas, causando alterações na atividade fotossintética líquida (EL HADRAMI, et al., 2010). Nesse contexto, o papel do metabolismo primário durante a interação planta patógeno é para manutenção da homeostase dos requisitos energéticos celulares para as respostas de defesa da planta. Essa energia é crítica durante a execução de respostas de proteção, devido à expressão de centenas de genes de múltiplas vias relacionadas aos mecanismos de defesa. Uma provável regulação negativa da fotossíntese alivia o gasto energético associado à regulação positiva de outras vias que fornecem essa energia, tal como o metabolismo secundário (ROJAS, et al., 2014).

O presente estudo investigou as alterações ecofisiológicas em plantas de soja submetidas a aplicação de MeJA, quitosana, e sua interação, a partir do metabolismo primário, através das trocas gasosas e o teor relativo de clorofila, sob a exposição ao agente patogênico *E. diffusa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As avaliações ecofisiológicas foram realizadas utilizando-se da infraestrutura do Laboratório de Ecofisiologia de Plantas.

Foram utilizadas plantas de soja da cultivar NA5909. Quatro sementes dessa cultivar foram semeadas em vasos plásticos contendo 5 Kg de solo peneirado e misturado com areia, na proporção 2:1, deixando-se desenvolver 3 plantas por vaso, num total de 80 vasos, sendo as plantas conduzidas até o estágio fenológico V5, seguindo as recomendações tecnológicas de produção de soja (EMBRAPA, 2011).

2.2 Aplicação dos produtos

Quando as plantas atingiram estágio fenológico V5, receberam a aplicação via foliar de quatro tratamentos distintos: quitosana, MeJA, interação entre os eliciadores (MeJA/quitosana), e uma testemunha (água destilada e espalhante adesivo). Para o tratamento controle foi utilizado água destilada e polioxietileno alquilfenol éter a 0,5% (Iharaguen-s®), um espalhante foliar adesivo. O MeJA foi utilizado na concentração de 1,25 mM preparado com o mesmo espalhante adesivo, assim como a quitosana na concentração de 3 mg/mL, preparada em ácido acético 0,5% (CH_3COOH), cuja solução permaneceu sob agitação constante “overnight” (PRAPAGDEE et al., 2007). Na interação dos produtos MeJA/quitosana estes foram aplicados de maneira sequencial, sem realização de mistura prévia, onde primeiramente aplicou-se a quitosana, e logo em seguida o MeJA, com o auxílio de um pulverizador manual tipo spray, até cobertura total das plantas. Após aplicação, todos os vasos foram cobertos com sacos plásticos transparentes por 24 h para evitar a sinalização das

plantas vizinhas. As plantas submetidas ao MeJA, além de cobertas, foram levados a uma casa de vegetação distinta, com as mesmas condições de temperatura, umidade e luminosidade, por um período de 24 h, no intuito de evitar a indução dos demais tratamentos e das plantas controle, uma vez que o MeJA é conhecido por ser um fitorregulador volátil (SEO et al.,2001).

2.3 Infecção das plantas por *Erysiphe diffusa*

Utilizou-se inoculo natural proveniente de plantas de soja exibindo sintomas e sinais típicos de oídio, distribuídas uniformemente próximas as plantas teste. A introdução dos vasos contendo plantas infectadas, na casa de vegetação, ocorreu quando as plantas sadias encontravam-se no estágio fenológico V3.

2.4 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas foram: análises de trocas de gasosas, teor relativo de clorofila e avaliação da severidade do oídio.

Para as avaliações foram utilizadas folhas em estágio fenológico V5. As trocas gasosas [taxas de fotossíntese, transpiração e condutância estomática], foram realizadas com o auxílio do analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA) da ADC Bioscientific Ltda. modelo LCPro +, entre os horários de 8 h às 10 h, período considerado de elevada atividade fotossintética. Foi realizada uma leitura por planta, tomando-se o folíolo central das folhas. O Índice de clorofila foi determinado pelo aparelho clorofilômetro portátil atLEAF+, onde foram realizadas 6 leituras por trifólio por planta, sendo duas leituras por folíolo.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 4, sendo 4 tratamentos (quitosana , MeJA, MeJa/quitsona e uma testemunha), 4 períodos de coleta, 2, 5, 8 e 11 dias após a aplicação (DAA), com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (FERREIRA, 2013). As

médias entre os tratamentos foram submetidas ao teste de Scott e Knott (1974), a 0,05 de probabilidade ($p \leq 0,05$).

2.5 Avaliação da severidade do Oídio da soja

As avaliações de severidade da *E. diffusa*, foram realizadas segundo a escala diagramática de Matiazzi (2003) (FIGURA 1), tendo início quando as plantas apresentaram os primeiros sintomas da infecção, no estágio fenológico V4. Foram realizadas 9 avaliações, com intervalos de 3 dias entre elas. A última avaliação ocorreu 18 dias após a aplicação dos tratamentos eliciadores. Com os dados obtidos calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) usando a equação (SHANER e FINNEY, 1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) \times 0,5] [t_{i+1} - t_i]$$

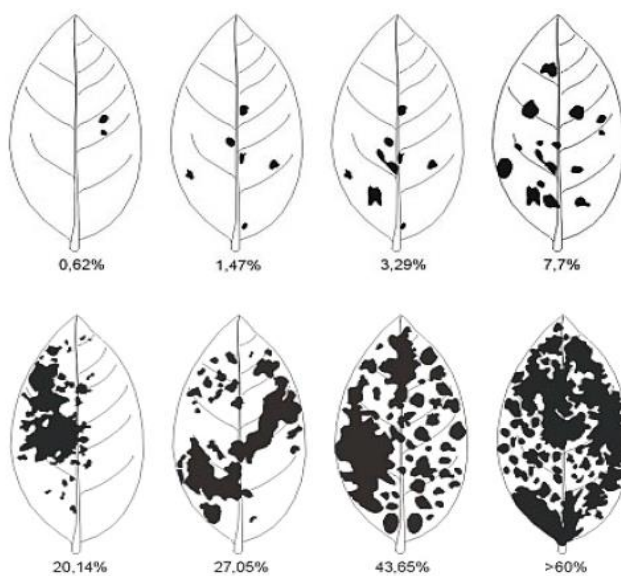
Onde:

n = número de avaliações;

y_i = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t_i = tempo no momento da i-ésima avaliação.

Figura 1 - Escala diagramática para severidade do oídio da soja, causado por *E. diffusa*



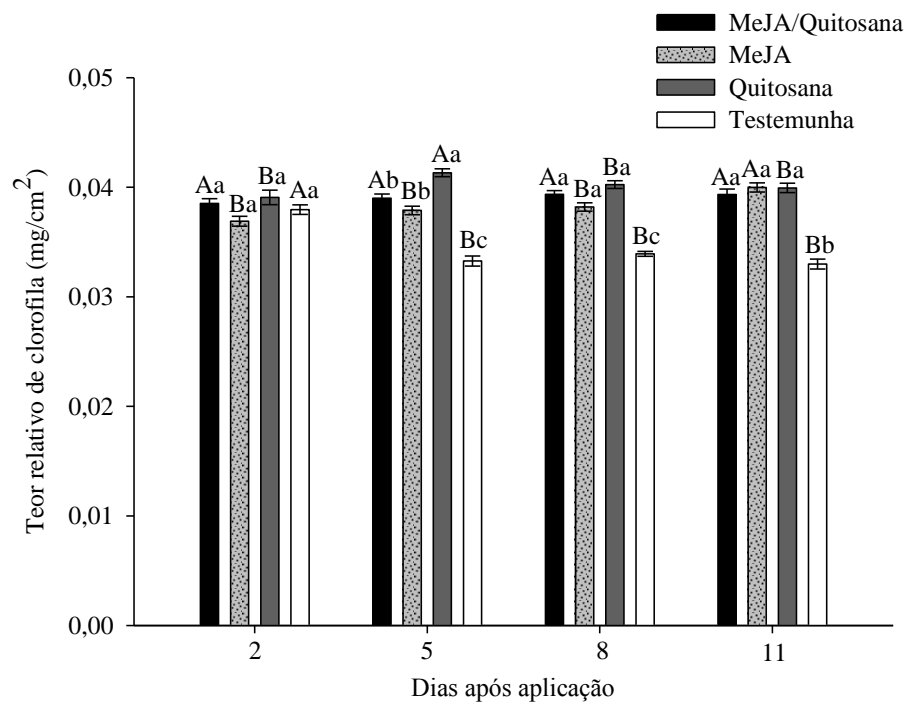
Fonte: MATTIAZZI, 2003.

3 RESULTADOS

Os tratamentos eliciadores não ocasionaram elevação dos teores relativos de clorofila, entretanto conferiram a eles estabilidade nos teores. A testemunha apresentou redução em seus níveis a partir de 5 dias após aplicação dos eliciadores (DAA) (FIGURA 2).

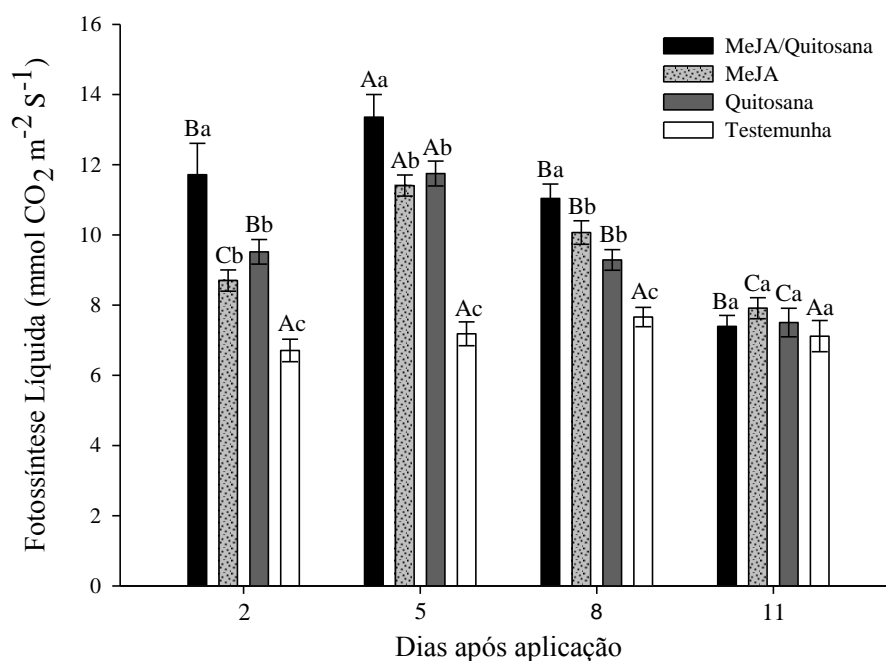
A taxa fotossintética das plantas de soja submetidas à aplicação de eliciadores foram impactadas positivamente pela aplicação dos mesmos, sendo a interação MeJA/quitosana o tratamento que proporcionou atividade mais significativa, pode ser observada esta resposta a partir de 2 DAA, seguida de decréscimo aos 8 DAA. Os demais tratamentos, tais como quitosana e MeJA comportaram-se de forma semelhante, porém, menos intensa. A atividade fotossintética da testemunha manteve-se a baixo dos valores encontrados para os tratamentos eliciados, e constante ao longo dos dias após aplicação (FIGURA 3).

Figura 2 - Teor relativo de clorofila em plantas de soja submetida a diferentes tratamentos com eliciadores



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Figura 3 - Taxa de fotossíntese líquida em plantas de soja submetida a diferentes tratamentos com eliciadores

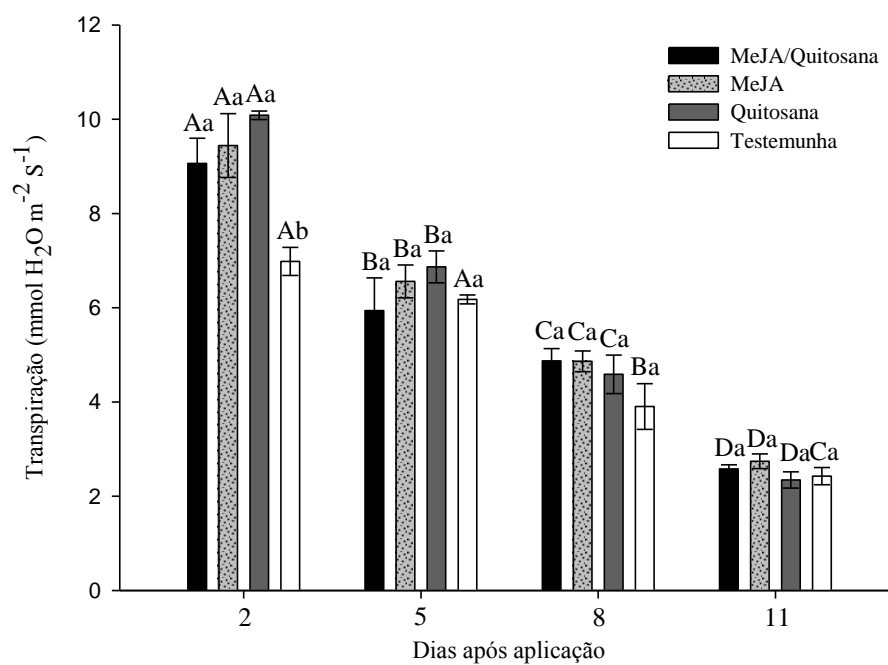


Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Houve um decréscimo da transpiração ao longo dos períodos avaliados. De maneira geral, todos os tratamentos, com eliciadores, proporcionaram maiores taxas transpiratórias, 2 DAA (FIGURA 4).

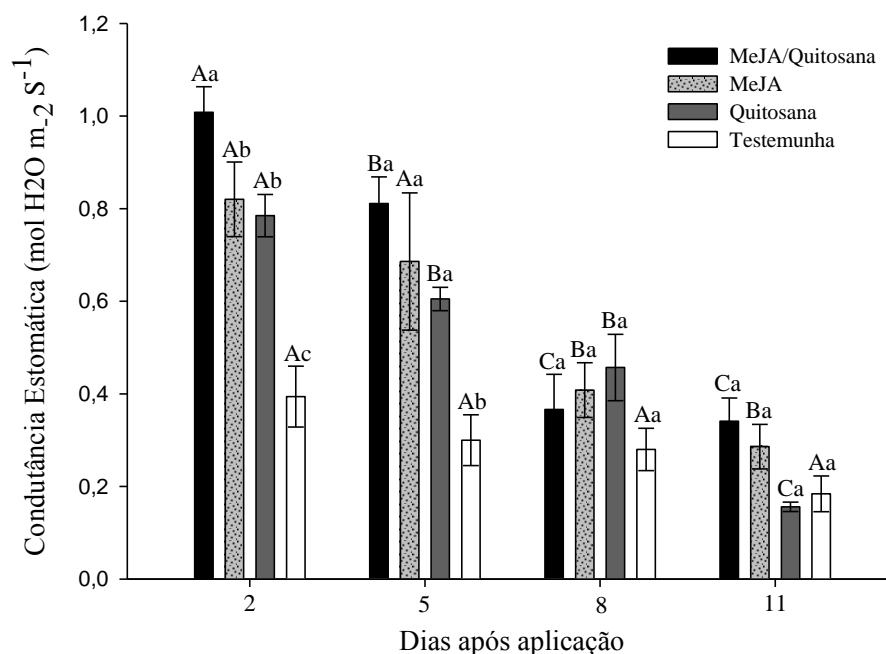
Foi observada redução da condutância estomática ao longo dos dias após aplicação dos eliciadores. A interação MeJA/quitosana proporcionou os maiores valores entre. Ressalta-se que, os tratamentos aplicados isoladamente conferiram elevadas taxas de condutância estomática, porém foram menos expressivas quando comparadas com a interação. Pode ser observado que aos 8 DAA, todos os tratamentos atingiram valores semelhantes (FIGURA 5).

Figura 4 - Taxa de transpiração em plantas de soja submetida a diferentes tratamentos com eliciadores



Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Figura 5 - Taxa de condutância estomática em plantas de soja submetida a diferentes tratamentos com eliciadores

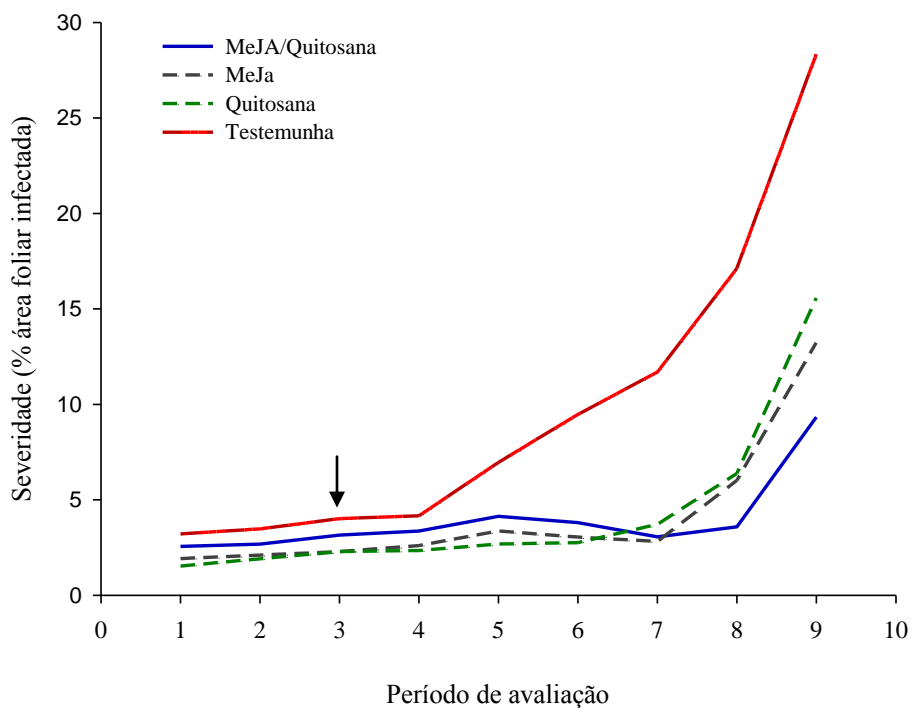


Legenda: Letras maiúsculas diferentes indicam variação estatística nos períodos de coleta dentro de cada tratamento, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam variação nos tratamentos dentro de cada período de coleta, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

O tratamento que conferiu menor severidade do oídio dentro do período avaliado, foi a interação MeJA/quitossana. Foi possível observar intensificação da infestação, por área foliar, apenas na oitava avaliação, ou seja, 15 dias após aplicação dos tratamentos. Resultados semelhantes podem ser observados quando MeJA e quitossana foram aplicados de forma isolada, entretanto esses suprimiram a infestação somente até a sétima avaliação, seguida de uma rápida elevação da severidade. Ao compararmos com a testemunha, esse aumento da severidade, deu-se na quarta avaliação, apresentando elevação linear em função do tempo. Com base nos dados da AACPD pode-se observar que, os menores

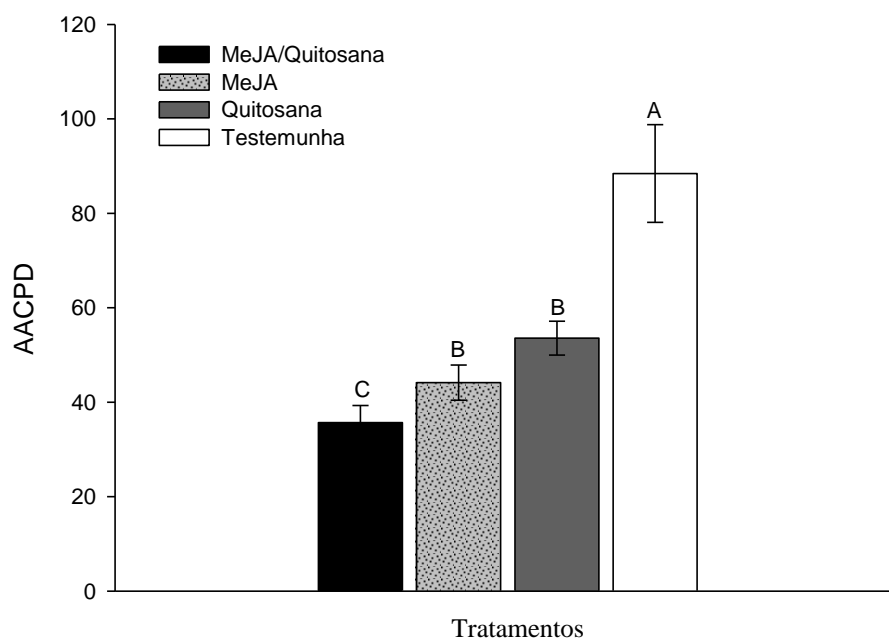
índices da doença foram obtidos pela interação MeJA/quitosana, seguida pela aplicação individual dos eliciadores (FIGURAS 5 e 6).

Figura 6 - Curvas de progresso da *E. diffusa* em plantas de soja, expresso em porcentagem de área foliar lesionada em função do tratamento eliciador e o período de avaliação



Legenda: A seta representa o momento da aplicação dos tratamentos eliciadores, no estágio fenológico V5.

Figura 7 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para severidade de *E. diffusa*, em plantas de soja submetidas a aplicação de eliciadores



Legenda: Letras diferentes indicam variação estatística entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

As plantas são constantemente expostas ao ataque de patógenos, como resultado, elas têm desenvolvido intrincados mecanismos para reconhecer e defender-se dos danos ocasionados. Uma dessas respostas de defesa é a regulação negativa da fotossíntese, tal como foi observado na presente investigação. Sugere-se que esta regulação negativa do metabolismo primário, atua como um desvio do mesmo, modulando assim uma cascata de transdução de sinal que levará a respostas de proteção, por aumentar a expressão de genes relacionados à defesa e à produção de metabólitos secundários em plantas (ROJAS et al., 2014). MeJA e, quitosana, e sua interação, provocaram fechamento estomático, e diminuição das demais trocas gasosas analisadas, sugerindo assim, que esses eliciadores podem intensificar as respostas de defesa contra o ataque do agente patogênico *E. diffusa*, porém reduções das taxas fotossintéticas também foram observadas.

A capacidade de reduzir a abertura estomática ou de reduzir a condutância estomática, mediada pela aplicação de quitosana, é frequentemente associada a uma elevação nos conteúdos intracelulares de ABA. Uma vez que, a enzima chave na biossíntese desse fitohormônio, a 9-*cis* epoxy-carotenoide dioxigenase, na via dos carotenoides, é regulada positivamente pela aplicação desse polímero. Dessa forma, o fechamento estomático observado é dependente de ABA (IRITI, et al., 2010). Essa regulação da abertura estomática promovida pela quitosana poderia proporcionar maior eficiência no uso da água, quando comparado às plantas não sinalizadas, e por consequência, regular positivamente as trocas gasosas. Em estudos realizados com plantas de soja, milho, quiabo e arroz, essa regulação permitiu elevação na atividade fotossintética (EL-TANTAWY et al., 2009; MONDAL e PUTEH, 2013; THEERAKARUNWONG E PHOTHI, 2016). Além disso, a elevação observada na fotossíntese, muitas vezes é relacionada ao aumento nos teores de clorofila

(MONDAL, et al., 2012). Mesmo que no presente estudo não tenha ocorrido alterações nos teores relativos de clorofila, é válido ressaltar que os mesmos mantiveram-se constantes durante todo o período avaliado, diferente das plantas testemunhas que sofreram reduções, sugerindo que a quitosana influenciou a manutenção dos níveis de clorofila.

A aplicação de MeJA quando comparado às testemunhas, apresentou manutenção de maiores valores para taxa fotossintética líquida, e das demais trocas gasosas analisadas. Esses resultados advêm do envolvimento deste fitohormônio na sinalização direta de defesa através da ativação das enzimas antioxidantes, proporcionando proteção ao aparato fotossintético (BILGIN et al., 2010). Entretanto, uma redução das trocas gasosas é observada ao longo das avaliações. Por isso, é importante salientar o papel desempenhado pelo MeJA nas respostas de defesa contra o ataque de patógenos, uma vez que esta que está fortemente associada com a fotossíntese. Este fitohormônio é sintetizado a partir da liberação intracelular do ácido α -linolênico, que é liberado do cloroplasto, em uma sequência de reações conhecidas como via dos octedecanoides, correlacionando-se assim com a fotossíntese, uma vez que a co-localização das reações fotossintéticas, encontram-se nos cloroplastos (WASTERNAK et al., 2014). Em estudos realizados com plantas de cevada e *Arabidopsis*, expostas a presença dos fungos *N. attenuata*, *B.cinerea* assim como de MeJA, observou-se uma diminuição da capacidade fotossintética pelo silenciamento de genes relacionados à ativação da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO) (MITRA e BALDWIN, 2009). Esta redução aponta para uma possível conexão entre MeJA e fotossíntese por meio de respostas de defesa.

Diante do exposto, a interação entre MeJA/quitosana, pode potencializar os efeitos obtidos quando aplicados isoladamente, atuando assim de forma sinérgica. Ambos os tratamentos provocam fechamento estomático de maneira semelhante ao hormônio vegetal ácido abscísico (ABA), uma vez que a

quitosana estimula sua síntese. Além disso, observou-se que a redução das trocas gasosas, ao longo do período avaliado, pode estar relacionada com a severidade da doença, uma vez que, *E. diffusa*, apresenta efeito direto sobre as taxas transpiratórias, condutância estomática e conseqüentemente taxa fotossintética líquida, visto que os estômatos caracterizam-se como um dos principais locais de infecção do patógeno, por meio da penetração direta (IGARASHI et al., 2010). A diminuição da condutância estomática, observada na presente investigação, pode estar relacionada à resposta de defesa contra o ataque do patógeno. Por conseguinte, afigura-se que, a fim de estabelecer um equilíbrio de energia favorável para a proteção, à supra regulação de vias relacionadas com a defesa é compensado pela regulação negativa dos genes envolvidos em outras vias metabólicas (ROJAS et al., 2014).

5 CONCLUSÃO

A atividade eliciadora de MeJA , quitosana e sua interação, conferiram alteração negativa do metabolismo primário, levando a respostas de defesa a *E.diffusa* através de metabólitos secundários. A partir da regulação das trocas gasosas, como o fechamento estomático e manutenção dos teores de clorofila, foi possível retardar o processo de infecção das plantas de soja pelo oídio.

REFERÊNCIAS

BILGIN, D. D. et al. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. **Plant, Cell and Environment**, Spain, v.34, p.1597-1613, October, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO –CONAB.
Acompanhamento as safra brasileira de grãos, SAFRA 2013/2014.
Observatório Agrícola. v.1, n.9, p. 1-80. Junho, 2015.

EL HADRAMI, A. et al. Chitosan in Plant Protection. **Marine Drugys**, Switzerland, v.8, n.4, p. 968-987, March, 2010.

EL-TANTAWY. Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. Department of Plant Production (Vegetables). **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 12,p.1164-1173, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologia de produção de soja**: região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**. V.35, n.6. 2013.

IGARASHI, S. et al.. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p.245-250, Londrina, 2010.

IRITI, M. et al. Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. **Biological Control**. v.54, p.241-247, 2010.

MATTIAZZI, P. **Efeito do oídio (*Microspora diffusa* Cooke & Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja. 2003**. Dissertação (Mestrado)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

MELO, L. J. V. Crescimento e produção de fava em função de laminas de irrigação e densidade de plantio. **Revista Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 37-41, 2014.

MITRA et al, RuBP Case activase (RCA) mediates growth-defense trade-offs: silencing RCA redirects jasmonic acid (JA) flux from JA-isoleucine to methyl jasmonate (MeJA) to attenuate induced defense responses in *Nicotiana attenuate*. **New Phytologist**, Rockville, v. 201, p.1385-1395, March, 2009.

MONDAL, M.M.A. & P PUTEH, AB. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in indian spinach, **Journal of Agroforestry and Environment**, Bangladesh, v.5, p. 99-102, 2013.

PRAPAGDEE, B. et al., The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* F. SP. *Glycines*. **bioresour. Technology**, San Diego, v.98, p.1353-1358, 2007.

ROJAS, C. M. et al, Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, New York, v. 5, n.17, p.1-12, February , 2014.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SEO, H.S. et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.98, n.8, p. 4788-4793, Apr. 2001.

THEERAKARUNWONG, D.C. e PHOTI, R. et al., Physiological and photosynthesis enhancement of Thai Rice (*Oryza sativa* L.) cultivars by chitosan. **International Journal of Science**, Nashville, v.13, p.37-49, 2016.

WASTERNAK C. Jasmonate: na Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. **Annals of Botany**, Beijing, v.100, n.4, p.681-697, May, 2014.