



Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*

Leonardo P. Boava¹, Odair J. Kuhn², Sérgio F. Pascholati³, Robson M. Di Piero⁴ & Edson L. Furtado¹

¹Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 18603-970, Botucatu, SP, Brasil; ²Setor de Fitopatologia, Universidade Federal do Pampa, 97650-000, Itaqui, RS, Brasil; ³Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, SALQ, Universidade de São Paulo, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil; ⁴Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

Autor para correspondência: Edson L. Furtado, e-mail: elfurtado@fca.unesp.br

RESUMO

Visando esclarecer alguns eventos bioquímicos durante o processo de infecção no patossistema *Puccinia psidii* x eucalipto, comparou-se o metabolismo relacionado à defesa em folhas em diferentes níveis de desenvolvimento, em clones (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) denominados VR e C0, com sessenta dias de idade, resistente e suscetível à ferrugem, respectivamente, determinando-se a atividade de peroxidases e quitinases. Cada tratamento foi composto de 4 repetições, em delineamento inteiramente casualizado, considerando: 2 clones, inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM) e água destilada; representados pelo 1º, 2º e 4º pares de folha (com tamanho equivalente a 1/5, 2/5 e 4/5 do desenvolvimento foliar total, respectivamente). A coleta das folhas ocorreu em 4 períodos: 0, 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Os resultados obtidos evidenciaram que apesar de apresentarem níveis superiores de atividade de quitinases e peroxidases, o efeito do ASM ou o efeito da *P. psidii* não alteraram a atividade dessas enzimas em folhas desenvolvidas (4º par) no decorrer do período. Alterações nos níveis das enzimas após a inoculação apenas foram observadas nas folhas em desenvolvimento (1º e 2º pares), evidenciando que a resposta à infecção foi acompanhada pela síntese dessas enzimas. Os maiores incrementos nas atividades enzimáticas ocorreram nas plantas do clone resistente 72 HAI e nas plantas do clone suscetível que foram tratadas previamente com ASM e posteriormente inoculadas com o *P. psidii*.

Palavras chave: *Eucalyptus*, ferrugem das mirtáceas, proteínas-RP, indução de resistência.

ABSTRACT

Chitinase and peroxidase activity in different stages of eucalypt leaves after inoculation with *Puccinia psidii* and acibenzolar-S-metil

To elucidate some biochemical processes during infection in the pathosystem *Puccinia psidii* x *eucalyptus*, the defense metabolism in different-stage leaves was compared between rust-resistant and susceptible clones, respectively. In addition, chitinase and peroxidase activities were assayed. Each treatment consisted of 4 replicates, in a completely randomized design: 2 clones, inoculated and not inoculated with *P. psidii*; sprayed with acibenzolar-S-methyl (ASM) and distilled water; and represented by the 1st leaf pair (size equivalent to 1/5 total leaf development), 2nd pair (2/5 total development), and 4th pair (4/5 total leaf length). Leaves were harvested in 4 periods: 0, 24, 72 and 96 hours after inoculation. Results indicated that ASM treatment or *P. psidii* action led to higher chitinase and peroxidase activity level but did not alter the expression of these activities in developed leaves (4th pair) during the experiment. Alterations in enzyme levels after inoculation were only observed in developing leaves (1st and 2nd pairs), which suggests that the response to infection was concomitant to chitinase and peroxidase synthesis. The highest increases in enzymatic activities were observed in resistant clones at 72 hours after inoculation and in susceptible ones previously treated with ASM and later inoculated with the pathogen.

Keywords: *Eucalyptus*, rust of Myrtaceae, PR-proteins, induction of resistance.

A ferrugem causada pelo agente etiológico *Puccinia psidii* G. Winter é uma das principais doenças do eucalipto no Brasil provocando prejuízos em viveiros e no campo

(Alfenas et al., 2004). Levantamentos efetuados em plantios seminais de *Eucalyptus grandis* nas regiões do Vale do Paraíba e sul do estado de São Paulo revelaram que 35% das árvores apresentavam ferrugem aos 6 meses de idade. As plantas altamente infectadas tiveram reduções de 25 a 35% em altura e diâmetro quando comparada com as sadias (Takahashi, 2002).

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Estadual Paulista. Botucatu SP. 2008.

O fungo ataca plantas jovens com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros como primórdios foliares, terminais de galhos e haste principal (Figueiredo, 2001). Os estágios de desenvolvimento foliar são muito importantes, pois as folhas são suscetíveis até o estágio 3, ou seja até os 3/5 do seu desenvolvimento em comprimento do limbo (Souza, 2008). O fungo *P. psidii* realiza complexas interações mediante hifas especializadas e os nutrientes são transportados através de sistemas de membrana especializados (Thordal-Christensen, 2003). Xavier et al. (2001) compararam o progresso da infecção de genótipos resistentes e suscetíveis de *Eucalyptus grandis* a *P. psidii* e verificaram que no genótipo suscetível, micélio primário e haustório foram observados 12 e 18 horas após inoculação, respectivamente, e no genótipo resistente 18 a 24 horas após inoculação, respectivamente.

A primeira linha de defesa de uma planta contra agentes invasores é a sua superfície, onde ocorre a aderência do patógeno, penetração e consequente infecção. A forma física da cutícula, o número de estômatos e de tricomas por área de epiderme são fatores importantes na definição do nível de resistência a patógenos por algumas espécies vegetais (Agrios, 2005). A planta ao ser invadida por um patógeno pode desencadear uma série de mecanismos de defesa na tentativa de conter o agente agressor. Após a infecção, pode-se aumentar o nível de compostos de defesa pré-existentes nas plantas ou ocorrer a ativação de outros mecanismos de resistência (pós-formados) que são sintetizados e acumulados nos tecidos do hospedeiro como as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas, calose, lignina, papilas, camadas de cortiça e tiloses (Pascholati & Leite, 1995).

Estudos recentes demonstram que a super expressão de genes de quitinases em plantas aumentam a resistência a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, componentes principais das paredes celular dos fungos, e pode apresentar atividade antimicrobiana (Van Loon et al., 2006). Segundo Pascholati & Leite (1995), a enzima peroxidase está diretamente ligada à lignificação dos tecidos, a qual polimeriza lignina a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos. Os mesmos autores argumentam que a lignificação e seus precursores tóxicos exercem papel importante na relação de resistência em plantas.

O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas, onde vários estudos revelam a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes de doença de plantas, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos são estimulados por vários indutores bióticos e abióticos. A indução da resistência pode ser desencadeada pela aplicação de substâncias naturais e/ou sintéticas, por microrganismos inativados e/ou por suas partes (Hammerschmidt & Dann 1997). Ácido salicílico e seus análogos funcionais estão entre os mais importantes indutores abiótico (Radwan et al., 2008). O composto

sintético benzo[1,2,3]tiodiazol-7-ácido carbotiólico-S-metil éster (ASM, CGA, BTH, Bion®) derivado de benzotiadiazol, um análogo funcional do ácido salicílico, tem sido extensivamente estudado como um indutor de resistência (Mandal et al., 2008)

Visando esclarecer alguns eventos bioquímicos durante o processo de infecção de plantas de eucalipto por *P. psidii*, comparou-se a atividade de peroxidases e quitinases entre folhas de plantas resistentes e suscetíveis à ferrugem com diferentes estágios de desenvolvimento. Também observou-se alterações das enzimas em plantas pulverizadas com indutor de resistência Acibenzolar-S-metil seguido ou não de inoculação com *P. psidii*.

Foram utilizadas mudas clonais de sessenta dias de idade provenientes de híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, denominados 'Urograndis', gentilmente cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel. De acordo com testes de resistência ao fungo *P. psidii* realizados no Setor de Defesa Fitossanitária/FCA/UNESP-Botucatu SP, por meio de índices de incidência e severidade da doença provenientes de levantamentos realizados pela própria empresa, foram selecionados dois clones de reação resistência e suscetibilidade conhecida. Sendo assim, o clone C0 foi utilizado como padrão de resistência à ferrugem e o clone VR como padrão de suscetibilidade.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto de quatro repetições, onde cada planta representou uma repetição. O indutor de resistência ASM, produto comercial Bion® 500WG (Syngenta) foi pulverizado na dose de 50 mg/L. Cinco dias após o tratamento com o indutor, as plantas foram inoculadas com *P. psidii*. A obtenção do inóculo consistiu na coleta de urediniosporos de *P. psidii* de plantas de eucalipto infectadas naturalmente no campo. A partir dessa coleta foi preparada uma suspensão de 5×10^4 urediniosporos /mL, em água destilada contendo Tween 80 (0,05%). O método de inoculação consistiu na aplicação da suspensão na face dorsal das folhas com o auxílio de uma bomba de vácuo e, em seguida, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento regulada para 21°C e fotoperíodo de 12 horas. Como testemunhas foram utilizadas plantas pulverizadas com água destilada não inoculadas com *P. psidii*.

As amostras foram representadas por 3 diferentes estágios de desenvolvimento foliar: 1º par de folha (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total), 2º par de folha (2/5 do desenvolvimento total) e 4º par (4/5 de desenvolvimento). A coleta das folhas foi realizada 0, 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI), sendo as folhas colocadas imediatamente em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer -80°C até o momento da determinação da concentração de proteína e das atividades de peroxidases e quitinases.

Amostras de 0,5 g de folhas de cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas em 4 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo 2,56 g de Polivinilpirrolidona (PVP) e

fluoreto de fenilmetilsulfonil 5mM (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 20.000g por 25 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado a -20°C. Os sobrenadantes foram utilizados para avaliação do teor de proteínas totais (Bradford, 1976) e atividades de quitinases (EC 3.2.1.14) e peroxidases (EC 1.11.1.7).

Para se avaliar a atividade de quitinases (EC 3.2.1.14) utilizou-se a metodologia descrita por Wirth & Wolf (1990), na qual ocorre a liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV). Para tanto, 200 µL do extrato protéico foram misturados com 600 µL do tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 (tampão de extração) e 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg mL⁻¹). Após a incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g por 5 min. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µL de tampão de extração + 200 µL de “CM-chitin-RBV”). A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) por volume de amostra (µg proteína mL⁻¹), foi

determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 µg mL⁻¹.

A atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) foi determinada a 30°C, através de método espectrofotométrico direto pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Luso & Pascholati, 1999). A mistura da reação continha 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade de peroxidases foi expressa como atividade específica (unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹). A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (µg proteína mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 µg mL⁻¹.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as folhas de estágio mais avançado (4º par) apresentaram níveis constitutivos superiores de atividade de quitinases e peroxidases em ambos os clones (Figuras 1A, 1C, 2A e 2C). No entanto, alterações nos níveis das enzimas após a inoculação apenas foram observadas nas folhas com

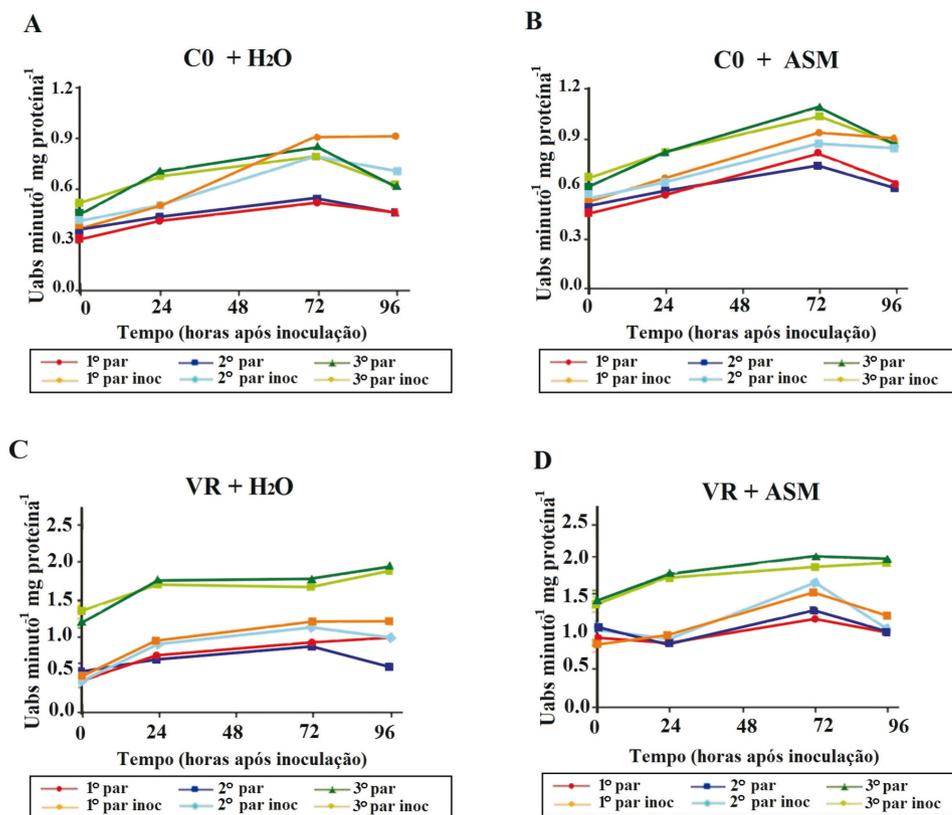


FIGURA 1 – A-C. Atividade de quitinases em tecidos foliares de clones de *Eucalyptus* resistentes (C0) e suscetíveis (VR) após inoculação com *Puccinia psidii*. Plantas dos clones C0 e VR foram pulverizadas com água ou; **B-D.** com acibenzolar-S-metil cinco dias antes da inoculação. As amostras foram representadas por 3 diferentes estágios de desenvolvimento foliar: 1º par de folha (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total), 2º par de folha (2/5 do desenvolvimento total) e 4º par (4/5 de desenvolvimento). Barras indicam o desvio padrão da média.

tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento ou em folhas equivalente a 2/5 do desenvolvimento total, com evidências que a resposta à infecção foi acompanhada pelo aumento na síntese de quitinase e peroxidase (Figuras 1A e C, 2A e C). Tal fato está relacionado com resultados apresentados por alguns autores, demonstrando presença de sintomas de ferrugem apenas nas folhas mais novas de eucalipto. Segundo Figueiredo (2001), a ferrugem do eucalipto ataca plantas jovens com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros como primórdios foliares. Para Santos (2001), a doença afeta os tecidos mais jovens da parte aérea das plantas, especialmente de mudas jovens, causando a morte do ápice. Dessa maneira, vale ressaltar que a combinação de características estruturais dos tecidos e as reações bioquímicas empregadas nos processos de defesa das plantas, como por exemplo, o aumento de atividades enzimáticas ou maiores níveis constitutivos destas enzimas, exercem papel crucial na resistência das plantas.

Souza (2008) quantificou caracteres anatômicos foliares do eucalipto, e estudou a micromorfologia de folha em três estágios de desenvolvimento de clones resistentes e suscetíveis a fim de relacionar esses fatores com a resistência à ferrugem, causada pelo fungo *P. psidii*. No estudo foram encontradas diferenças estruturais entre os clones e entre os níveis de desenvolvimento das folhas. O clone resistente e as folhas mais desenvolvidas apresentaram maior espessura das

cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliádico adaxial, maior porcentagem de parênquima paliádico, maior número e área de cavidades oleíferas, menor espessura da epiderme abaxial e menor espessura e porcentagem de parênquima lacunoso. Segundo a autora, essas características podem dificultar a penetração do patógeno e a sua colonização nos tecidos do hospedeiro.

Com base nos resultados obtidos nas amostras das folhas menos desenvolvidas, constatou-se que as plantas de ambos os clones aspergidas com água destilada apresentaram estabilidade nos níveis de atividade das enzimas no decorrer do período, e quando inoculadas apresentaram aumento na atividade das enzimas 72 HAI (Figuras 1A e C, 2A e C). Em relação à diferença entre os clones, embora a atividade de quitinases e peroxidases mensurada no clone suscetível tenha sido maior, os incrementos na atividade das enzimas foram mais expressivos após inoculação com o patógeno no clone resistente. Anjana et al. (2008) observaram em plantas de girassol 2 horas após inoculação com *Alternaria helianthi* maiores atividades de peroxidases em genótipos resistentes do que em genótipos suscetíveis.

Com relação ao efeito do ASM não foi observado alteração na atividade de peroxidases quando comparado plantas tratadas dos clones C0 e VR (Figura 2B e 2D) com as testemunhas (Figura 2A e 2C). No entanto, quanto ao efeito

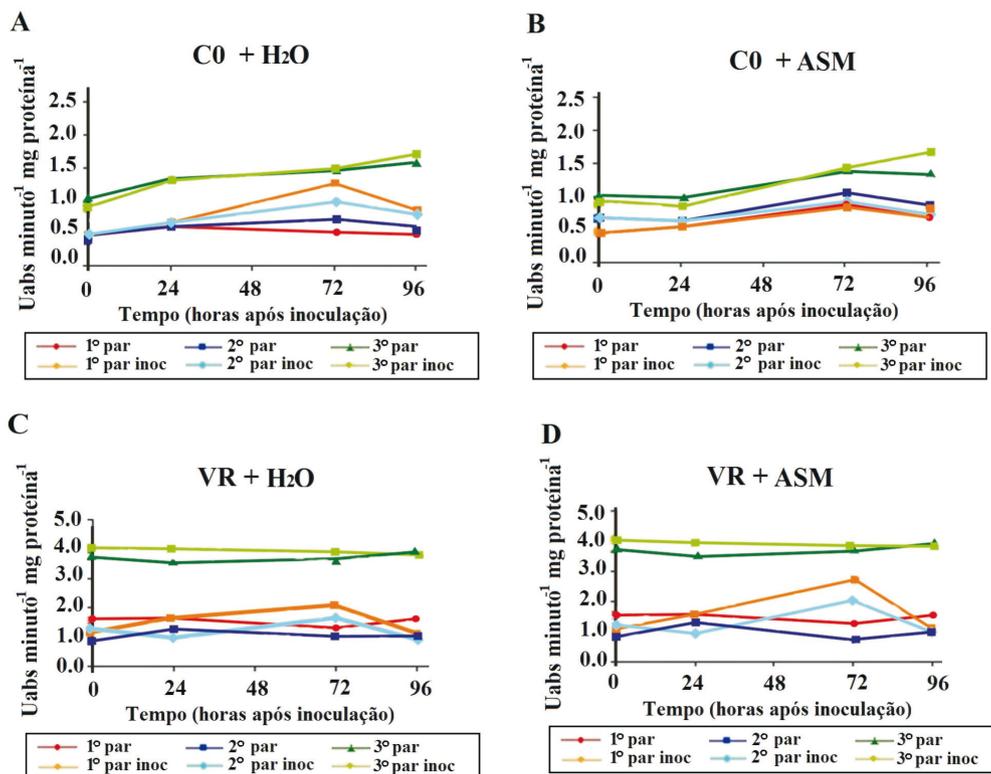


FIGURA 2 - A-C. Atividade de peroxidases em tecidos foliares de clones de *Eucalyptus* resistentes (C0) e suscetíveis (VR) após inoculação com *Puccinia psidii*. Plantas dos clones C0 e VR foram pulverizadas com água ou; **B-D.** com acibenzolar-S-metil cinco dias antes da inoculação. As amostras foram representadas por 3 diferentes estágios de desenvolvimento foliar: 1º par de folha (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total), 2º par de folha (2/5 do desenvolvimento total) e 4º par (4/5 de desenvolvimento). Barras indicam o desvio padrão da média.

do ASM na atividade de quitinases, ocorreu aumento quando comparada com plantas que não receberam tratamento em ambos os clones (Figura 1A-D). O aumento da atividade da enzima pode estar ligado à capacidade do ASM em ativar mecanismo de defesa da planta. Essa indução anteciparia prováveis reações bioquímicas de defesa que só seriam ativadas, por exemplo, com o ataque de um patógeno. O aumento da atividade da quitinases seria resultante da adaptação das células da planta frente a condições adversas que geram estresse, no caso a aplicação do indutor. Com isso, a planta provavelmente estaria em condições de demonstrar resistência contra patógenos para os quais é suscetível.

As folhas menos desenvolvidas de ambos os clones também apresentaram um aumento de atividade das enzimas quando as plantas foram tratadas previamente com o composto ASM e, posteriormente, inoculadas com o patógeno (Figura 1B-1D, 2B-2D). Esse aumento foi mais expressivo na plantas do clone VR (Figura 1D e 2D) com evidências que esse mecanismo foi acionado, pois apresentou maior expressão a partir do desafio com o patógeno em plantas pré-condicionadas pelo efeito do ASM. O pré-condicionamento, importante componente da resistência sistêmica adquirida, está associado ao aumento da capacidade para rápida e efetiva ativação das respostas de defesa celular, as quais são induzidas somente após o contato com o patógeno desafiante (Conrath et al., 2002). Quando a planta é induzida pela presença de um eliciador, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada à planta induzida com o mesmo eliciador e, posteriormente, desafiada com patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais apta para responder a presença do patógeno (Kuhn et al., 2006).

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP pelo apoio financeiro e a concessão de bolsa de Doutorado ao primeiro autor. Os autores agradecem aos colegas Cezar Bonine, Donizete C. Dias da equipe de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel - VCP, por cederem material contrastante para este estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios GN (2005) Plant Pathology. San Diego CA. Academic Press.
Alfenas AC, Zauza EAV, Mafía RG, Assis TF (2004) Clonagem e doenças do eucalipto, Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.
Anjana G, Kini KR, Shetty HS, Prakash HS (2008) Changes in Peroxidase Activity in Sunflower during Infection by Necrotrophic Pathogen *Alternaria helianthi*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 41:586-596.

Bradford MA (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science 7:210-216.

Figueiredo MB (2001) Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. O Biológico 63:29-32.

Hammerschmidt H, Dann EK (1997) Induced resistance to disease. In: Rechcigl NA, Rechcigl JE (Eds.) Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton FL. CRC Lewis Publishers. pp. 177-199.

Kuhn OJ, Pascholati SF, Cardoso Filho JA, Portz RL, Osswald W (2006) Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. In: Luz WC (Ed.) Revisão Anual de Patologia de Plantas 14:249-300.

Lusso MFG, Pascholati SF (1999) Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. Summa Phytopathologica 25:244-249.

Mandal B, Mandal S, Csinos AS, Martinez N, Culbreath AK, Pappu HR (2008) Biological and Molecular Analyses of the Acibenzolar-S-Methyl-Induced Systemic Acquired Resistance in Flue-Cured Tobacco Against *Tomato spotted wilt virus*. Phytopathology 98:196-204.

Pascholati SF, Leite B (1995) Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres. vol. 1, pp. 417-453.

Radwan DEM, Lu G, Fayez KA, Mahmoud SY (2008) Protective action of salicylic acid against bean yellow mosaic virus infection in *Vicia faba* leaves. Journal of Plant Physiology 165:845-857.

Santos AF, Auer SG, Gricoletti Junior A (2001) Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Colombo PR. Embrapa Florestas. Circular Técnica no. 45.

Souza RRS (2008) Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu SP.

Takahashi SS (2002) Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados à intensidade da doença no campo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu SP.

Thordal-Christensen H (2003) Fresh insights into processes of non-host resistance. Current Opinion in Plant Biology 6:351-357.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-62.

Wirth SJ, Wolf GA (1990) Dye-labeled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. Journal of Microbiological Methods 12:197-205.

Xavier AA, Alfenas AC, Matsuoka K, Hodges CS (2001) Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. Australasian Plant Pathology 30:277-281.

TPP 8129 - Recebido 27 Outubro 2008 - Aceito 26 Junho 2009
Editor de Seção: Mario Lucio V. de Resende