

AVALIAÇÃO DO *Trichoderma harzianum* T1A, COMO ELICITOR DE PROTEÍNAS EM *Vitis vinifera*

¹Boscato, R. ¹; Zampieri, D. ¹; Magrini, F.¹; Dillon, A. J. P.¹; Souza, P. V. D² Rute T. Silva-Ribeiro, R. T. ¹

RESUMO

Plantas quando elicitadas podem produzir respostas de defesa. Foi avaliada a produção de peroxidase, quitinase e glicanase em *Vitis vinifera* após tratamentos biológico e convencional.

Palavras-chave: proteínas PR, mildio e podridão cinzenta.

INTRODUÇÃO

O clima úmido da região serrana do Rio Grande do Sul favorece o desenvolvimento de fitopatógenos que comprometem a qualidade e a produtividade da uva. Os tratamentos a base de fungicidas químicos tem sido a única alternativa de controle dessas doenças, levando ao desequilíbrio ecológico, a produção de uvas com resíduos químicos e a intoxicação dos produtores e das plantas, além de representarem um custo muito alto. Os principais agentes de doença, *Plasmopara viticola* (mildio) e *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta) atacam as plantas nos períodos quentes e chuvosos, destruindo as folhas e os cachos da videira. Linhagens do fungo *Trichoderma harzianum* podem estimular a planta a produzir proteínas relacionadas a resistência. Foi relatado a expressão de genes relacionados a resposta de defesa, em cultura de células de *Vitis vinifera*, quando elicitadas por enzimas de *T. viride*. Como não existem dados sobre o aumento da expressão de proteínas relacionadas a resistência em plantas adultas, este trabalho avaliou a resposta de plantas adultas de *V. vinifera*, das variedades Cabernet Sauvignon, Barbera e Sangiovese à elicitação, provocada pela aspersão aérea de uma calda a base de *T. harzianum* T1A.

¹ ¹ Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul; ² Departamento de Horticultura e Silvicultura. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail rtsribei@ucs.br

MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes foram realizados em vinhedo de *Vitis vinifera* variedade Cabernet Sauvignon, situado no município de Nova Pádua. O experimento foi dividido em 4 blocos constituídos de 15 plantas distribuídas em 3 filas de cinco plantas. Foram marcadas para amostragem apenas as 3 plantas centrais de cada bloco. Os testes em estufa com as variedades Sangiovese e Barbera foram realizados no IB-UCS. O experimento foi planejado em 4 blocos da variedade Sangiovese e 5 blocos da variedade Barbera, constituídos de 3 plantas por bloco.

Microrganismos: No tratamento biológico foi pulverizada a linhagem T1A de *T. harzianum*, na concentração de 3.10^{12} UFC/ha. No tratamento convencional foram pulverizados fungicidas químicos, conforme Andrei (1999) e Amorim & Kuniyuki (1997). As parcelas foram tratadas de setembro de 2003 a fevereiro de 2004.

Elicitação de proteínas: A elicitação de resposta de defesa foi realizada em 20/12/2003 e as amostras foram coletadas nos tempos 0h, 24h, 72h, 120h e 165 h após a aplicação dos respectivos tratamentos para a extração e análises das atividades enzimáticas.

Extração de Proteínas: A extração das proteínas do tecido foliar foi realizada conforme Calderón *et al.* (1992).

Atividade peroxidase: A atividade peroxidase foi avaliada no extrato foliar cru, pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984).

Precipitação das proteínas: As proteínas foram precipitadas conforme Alfenas (1991).

Atividade quitinase: A atividade quitinase foi avaliada na fração precipitada, pela hidrólise do substrato quitina coloidal segundo Pinto *et al.* (1997), sendo os açúcares redutores liberados dosados pelo método descrito por Miller (1959).

Atividade β -1,3-glicanase: A atividade β -1,3-glicanase foi avaliada na fração precipitada, pela hidrólise do substrato laminarina segundo Noronha & Ulhoa (1996) e os açúcares redutores liberados dosados conforme Miller (1959). As atividades enzimáticas foram expressadas em unidades internacionais (UI) por mL definidas como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de produto por mL, por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento a campo: Conforme os resultados apresentados na Figura 1, no extrato de folhas de *V. vinifera* **Cabernet Sauvignon** foi identificado as atividades peroxidase, quitinase e β -1,3-glicanase. As enzimas foram produzidas e variaram durante todo o período avaliado, não sendo detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, podendo ser sugerido que este

resultado seja devido ao próprio comportamento fisiológico da planta, uma vez que não foi possível constatar aumento da produção das enzimas após aplicação dos tratamentos.. Especificamente, na atividade quitinase (B) foi observado um aumento nas 120 horas, o que não ocorreu para glicanase (C).

Experimento em condições de estufa: Nos tratamentos realizados com as cultivares **Sangiovese** (Fig.2 A, B e C) e **Barbera** (Fig.2 D, E e F), pode ser observado que as enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glicanase foram produzidas e variaram durante todo o período avaliado, não sendo detectadas diferenças significativas entre os tratamentos. Da mesma forma como já foi sugerido para os resultados a nível de campo, estes resultados sugerem que seja devido ao próprio comportamento fisiológico da planta, uma vez que não foi possível constatar aumento da produção das enzimas após aplicação dos tratamentos.

CONCLUSÕES PARCIAIS

1) As *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Barbera expressaram atividade peroxidase, quitinase e β -1,3-glicanase.

2) Não houve diferença significativa na expressão e produção das enzimas, entre os tratamentos biológico, convencional e testemunha.

3) Não foi possível correlacionar as atividades enzimáticas com os indutores ou a maneira como foram empregados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Imprensa Universitária. Viçosa, MG.
- AMORIM, A.; KINOYUKI, O. 1997. In **Manual de Fitopatologia**- H. Kimati, L. Amorim, A. Bergamin Filho, L.E.A. Camargo, J.A.M. **Rezende** v. 2, p. 159 a 163.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochem**, New York, v.72, p. 248-254.
- CALDERÓN, A.; ZAPATA, M.; MUÑOZ, R.; PEDREÑO, A.; RÓS BARCELÓ, A. 1993. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. **New Phytol** **124**:455-463.
- LEONOWICZ E A. GRZYWNOWICZ K. 1980. Quantitative estimation of laccase in same wite-rot fungi usinng syringaldazine as substrate. Pp. 55-58. **Enzyme Microb. Techonol.**, 1981, Vol.3
- MANDELLI, F. 2003. Comportamento da Safra 2003 na Serra Gaúcha. **Embrapa Uva e Vinho**. Comunicado Técnico 46.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chem** **31**:426-428.

PINTO, A. S.; BARRETO, C.C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C.J.; VAINSTEIN, M.H. 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomo pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Can J Microbiol** 43:322-327

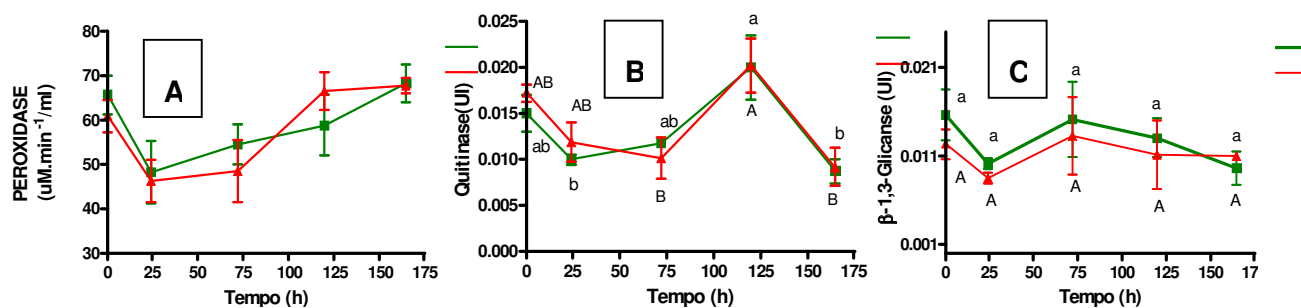


Fig.1. Atividade peroxidase(A), quitinase(B) e β-1,3-glicanase(C) em extrato de folhas de C. Sauvignon. ■ tratamento biológico; ▲ tratamento convencional.

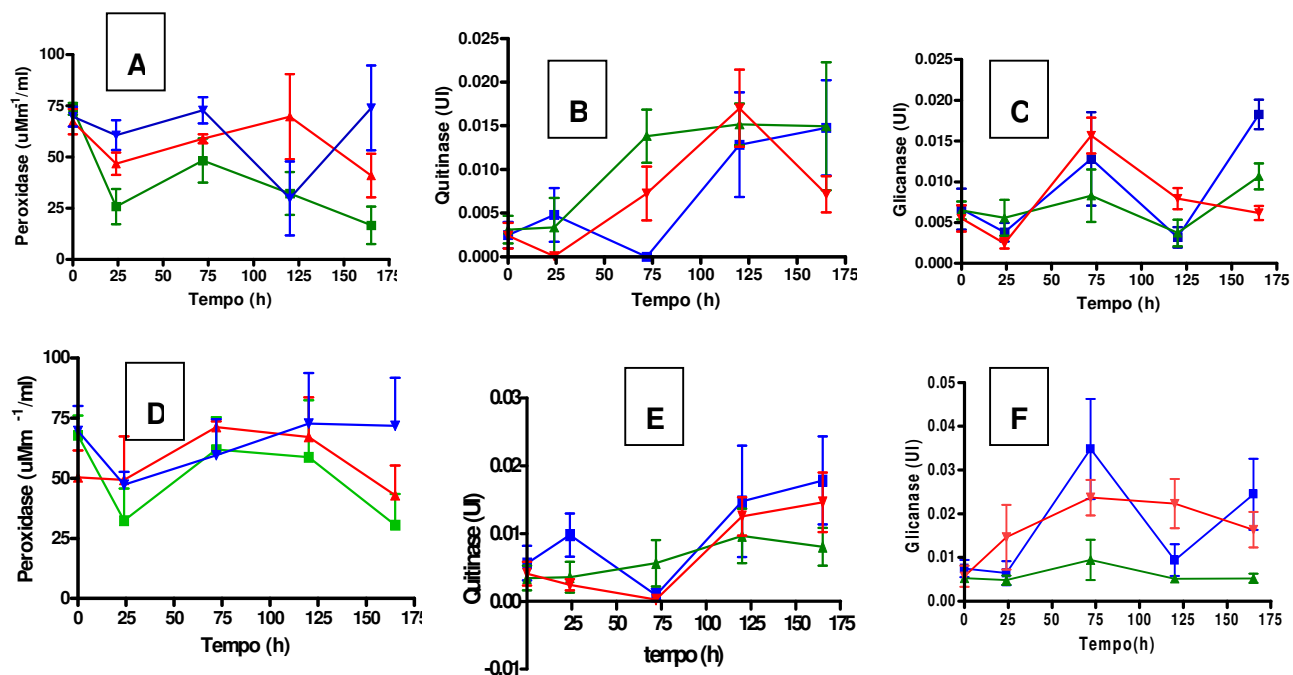


Fig.2. Atividade peroxidase, quitinase e β-1,3-glicanase em extrato de folhas de Sangiovese (A, B e C) e Barbera (D, E e F). ■ tratamento biológico; ▲ tratamento convencional; ● testemunha.