

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DARCY MAYRA FURTADO GONDIM

**AÇÃO DO ACIBENZOLAR-S-METIL NA RESPOSTA BIOQUÍMICA DE DEFESA  
DO MELÃO DESAFIADO PELO *Fusarium pallidoroseum*  
E DO MELOEIRO var. ORANGE FLESH**

FORTALEZA – CEARÁ  
2006

**DARCY MAYRA FURTADO GONDIM**

**AÇÃO DO ACIBENZOLAR-S-METIL NA RESPOSTA BIOQUÍMICA DE DEFESA DO MELÃO DESAFIADO PELO *Fusarium pallidoroseum* E DO MELOEIRO var. ORANGE FLESH**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Bioquímica.

Comitê de Orientação:

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Co-Orientador: Dr. Daniel Terao

FORTALEZA  
2006

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

G635a Gondim, Darcy Mayra Furtado

Ação do acibenzolar-S-metil na resposta bioquímica de defesa do melão desafiado pelo *Fusarium pallidoroseum* e do meloeiro var. Orange Flesh / Darcy Mayra Furtado Gondim  
85 f. il., color. enc.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Co-Orientador: Dr. Daniel Terao

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

1. *Cucumis melo* var. Orange flesh 2. Defesa bioquímica vegetal 3. Indução de resistência I. Oliveira, José Tadeu Abreu de II. Universidade Federal do Ceará – Curso de Bioquímica III. Título

CDD 574.192

**DARCY MAYRA FURTADO GONDIM**

**AÇÃO DO ACIBENZOLAR-S-METIL NA RESPOSTA BIOQUÍMICA DE DEFESA  
DO MELÃO DESAFIADO PELO *Fusarium pallidoroseum*  
E DO MELOEIRO var. ORANGE FLESH**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 10 de março de 2006.

**BANCA EXAMINADORA**

.....  
Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
(Orientador da Dissertação)

.....  
Dra. Ilka Maria Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
(Examinadora)

.....  
Dra. Vânia Maria Maciel Melo  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Biologia  
(Examinadora)

A Deus,  
À minha família,  
dedico com muito amor.

## AGRADECIMENTOS

Em especial ao professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira pela criteriosa orientação, dedicação, confiança e compreensão durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Daniel Terao, co-orientador deste trabalho, por ter me acolhido de forma receptiva em seu instituto, permitindo realização de parte dos experimentos desenvolvidos neste trabalho. Também pelas valiosas sugestões e ensinamentos.

As professoras Dra. Ilka Maria Vasconcelos e Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pela disponibilidade em aceitar participar da avaliação desta dissertação e valiosas sugestões que contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.

Ao Sr. José Helinton Severo Almeida, da empresa Potyfrutas – Mossoró-RN, que forneceu parte dos frutos utilizados neste trabalho.

À amiga Aparecida Simone Martins-Miranda, pelo companheirismo, ensinamentos e apoio na realização dos experimentos deste trabalho.

Com carinho especial às amigas Betânia e Hévila, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e pela excelente convivência.

Aos amigos do laboratório Hélio, Edvar, Eduardo, Alethéia, Vadjah Ygor, Thiago, Fred, Fernando, Raissa, Ivina, Gabriela, Germano e Wladmir pelo companheirismo demonstrado.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que muito contribuíram para a minha formação científica.

Ao grupo do Laboratório de Proteínas Tóxicas Vegetais, pelo apoio e companheirismo sempre prestados.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica pelo apoio, atenção prestada e dedicação às funções realizadas.

Ao secretário da Coordenação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Márcio, pela atenção sempre prestada.

A todos que compõe a EMBRAPA, Agroindústria Tropical. Em especial aos grupos do Laboratório de Fitopatologia e Laboratório de Pós-colheita.

Ao pesquisador Dr. Jorge Anderson, pela atenção e apoio na obtenção dos melões.

Aos colegas Fabio e Jefté, pelo apoio nos experimentos.

De forma muito especial, à minha mãe, Maria Olinda, pela dedicação em toda a minha formação, que me possibilitou chegar até aqui.

Com carinho agradeço meu pai, Antonio Brasileiro, e meu irmão, Fernando Antônio pelo carinho e incentivo.

À minha avó, Maria Darci Brito, que sempre me apoiou durante todos os momentos da minha vida.

A toda minha família, tias e primos.

A todos que contribuíram para a execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará em cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de Pós-Graduação concedida à autora, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, cujos laboratórios foi realizado parte dos experimentos deste trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), através de convênio com o programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.



## RESUMO

### **AÇÃO DO ACIBENZOLAR-S-METIL NA RESPOSTA BIOQUÍMICA DE DEFESA DO MELÃO DESAFIADO PELO *Fusarium pallidoroseum* E DO MELOEIRO var. ORANGE FLESH**

O melão tem grande importância para a economia brasileira, sendo sua produção exportada principalmente para os países da União Européia. Assim, é fundamental o controle de doenças pós-colheita deste fruto. O *Fusarium pallidoroseum* é um importante fitopatógeno que provoca podridões no melão. Esta doença representa um obstáculo sério em sua comercialização. Este trabalho avaliou os efeitos do BTH, um análogo estrutural e funcional do ácido salicílico, nas respostas bioquímicas da defesa do melão desafiado com o *F. pallidoroseum* e do meloeiro não desafiado. Doze horas depois de colhidos, os melões foram mergulhados em soluções de BTH (concentrações de 0,5, 1,0, e 2,0 mM de ingrediente ativo) e, depois 60 horas, foram inoculados com o fungo. Amostras dos frutos (2 cm diâmetro x 1 cm de profundidade), próximos ao local de infecção, foram retiradas em 3, 7 e 10 dias após inoculação, pesadas e armazenadas à -84 °C até serem utilizadas. Plantas do melão de 8 dias foram borrifadas com 300 µL de BTH nas concentrações de 0,3, 0,5, e 1,0 mM. As folhas secundárias foram colhidas em 2, 4, 6, 8, 10, 12, e 14 dias após tratamento. Além da avaliação do sintoma nos frutos, extratos totais do fruto e das folhas secundárias foram preparados com tampão acetato 50 mM, pH 5.2, contendo 150 mM de NaCl, e os índices de proteína e as atividades enzimáticas da peroxidase (POX), da fenilalanina amônia liase (PAL), da β-1,3-glucanase (GLU), da peroxidase do ascorbato (APX) e da superoxide dismutase (SOD) foram medidos. Observou-se que BTH não reduziu significativamente a incidência e a severidade da podridão causada pelo patógeno. Nem 2 mM de BTH modificou significativamente as atividades de enzimas relacionadas a defesa do fruto. Ao contrário, nas plantas do melão, BTH aumentou as atividades da POX, GLU e da SOD, mas não modificou a PAL e APX foi inibida. Estes resultados sugerem que BTH não trabalhou como um indutor de defesas bioquímicas no melão, mas induziu respostas de defesa nas plantas. Conseqüentemente, sugere-se que BTH poderia ser usado como uma estratégia tecnológica para a proteção de frutas do melão contra a podridão causada pelo *F. pallidoroseum* através da indução das respostas bioquímicas de defesa da própria planta, que, provavelmente, estará transferindo estas características aos frutos. Entretanto, esta hipótese que está sendo proposta necessita ser avaliada.

Palavras-chave: *Cucumis melo* var. Orange flesh, acibenzolar-S-metil, *Fusarium pallidoroseum*, defesa vegetal.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF ACIBENZOLAR-S-METHYL ON THE BIOCHEMICAL DEFENSE RESPONSES OF MELON FRUITS CHALLENGED WITH *Fusarium pallidoroseum* AND OF MELON PLANTS var. ORANGE FLESH

Melon fruit constitutes one of the main segments of the Brazilian economy. Its production is exported particularly to countries in the European Union. Thus it is fundamental the control of postharvest diseases of melon. *Fusarium pallidoroseum* is an important phytopathogen which provokes rot in melon fruits. This disease represents a serious obstacle in its commercialization as a foreign commodity. In this present work the effects of BTH, a structural and functional analogue of salicylic acid, on the biochemical defense responses of melon fruits challenged with *F. pallidoroseum* and of unchallenged melon plants were assessed. Twelve hours after harvesting melon fruits were immersed in BTH (0.5, 1.0, and 2.0 mM concentrations of active ingredient) and 60 hours later inoculated with the fungus. Fruit cuts (2 cm diameter x 1 cm deep), close to the inoculation sites, were excised at 3, 7, and 10 days after fungal inoculation, weighed and kept at -84 °C until used. Eight day-old melon plants were sprayed with 300 µL BTH at 0.3, 0.5, and 1.0 mM concentrations. Secondary leaves were harvested at 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 hours after sprayings. Besides to symptom evaluation in melon fruits, crude extracts from the fruit cuts and leaves were prepared with 50 mM acetate buffer, pH 5.2, containing 150 mM NaCl, and the protein contents and enzymatic activities of peroxidase (POX), phenylalanine ammonia lyase (PAL),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU), ascorbate peroxidase (APX), and superoxide dismutase (SOD) were measured. It was observed that BTH did not reduce significantly the incidence and severity of the rot caused by the pathogen. Neither 2 mM BTH significantly modify the activities of defense-related enzymes in melon fruits. Contrary, in the melon plants, BTH increased the activities of POX, GLU, and SOD, but did not modify PAL and further inhibited APX. These results suggest that BTH did not work as an inductor of biochemical defenses in melon fruits, but it induced defense responses in the melon plants. Therefore it is suggested that BTH could be used as a technological strategy for protection of melon fruits from the rot caused by *F. pallidoroseum* by means of induction of biochemical defense responses of the melon plant itself which will likely be transferring these traits to its fruits. However, this hypothesis that is being proposed needs to be assessed.

Key-words: *Cucumis melo* var. Orange flesh, acibenzolar-S-methyl, *Fusarium pallidoroseum*, plant defense.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Caracterização dos principais tipos comerciais de melão plantados no Brasil (adaptado de Chaves <i>et al.</i> , 2003).	3
2	Modelo esquemático demonstrando níveis e padrões de mudanças de substâncias (relacionadas à resistência natural a doenças) pré-formadas e induzíveis, durante a maturação do fruto na planta e depois de colhido não induzido e induzido em diferentes etapas.	14
3	Comparação das estruturas dos indutores de respostas de defesa vegetal, ácido salicílico e acibenzolar-S-metil (BTH).	17
4	Fruto do meloeiro var. Orange flesh ferido em quatro pontos. Setas indicando os ferimentos.	23
5	Caixas ensacadas após inoculação: (A) caixa representando uma unidade experimental do Experimento I e (B) figura mostrando todos os tratamentos.	24
6	Caixa representando uma unidade experimental do Experimento I.	26
7	Forma de coleta das amostras dos frutos: (A) corte do fruto com furador e (B) detalhe da amostra, padronizadas para 1 cm de profundidade.	29
8	Estado da planta do meloeiro var. Orange flesh no dia do tratamento: (A) vaso representando uma repetição; (B) detalhe do estado da planta no dia do tratamento.	34
9	Efeito de diferentes concentrações de BTH na incidência (número de lesões apresentando doença) da podridão em frutos de meloeiro var. Orange flesh, causada por <i>Fusarium pallidorozeum</i> em diferentes dias após inoculação. Frutos controles foram tratados com água. Médias comparadas pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) não apresentaram diferença significativa.	38
10	Efeito de diferentes concentrações de BTH na severidade (tamanho da lesão) da podridão em frutos de meloeiro var. Orange flesh causada por <i>Fusarium pallidorozeum</i> em diferentes dias após inoculação. Frutos controles foram tratados com água. Médias comparadas pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) não apresentaram diferença significativa.	39
11	Aspecto visual dos frutos do meloeiro var. Orange flesh inoculados com <i>Fusarium pallidorozeum</i> no 4º dia após inoculação. Os números representam os diferentes tratamentos: 1- controle (água), 2- 0,5 mM de BTH, 3- 1,0 mM de BTH e 4- 2,0 mM de BTH.	40
12	Aspecto visual dos frutos do meloeiro var. Orange flesh inoculados com <i>Fusarium pallidorozeum</i> no 8º dia após inoculação. Os números representam os diferentes tratamentos: 1- controle (água), 2- 0,5 mM de BTH, 3- 1,0 mM de BTH e 4- 2,0 mM de BTH.	41
13	Efeito de diversas concentrações de BTH no crescimento micelial de <i>Fusarium pallidorozeum</i> em diferentes tempos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tempos ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.3).	42
14	Atividade da peroxidase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com <i>Fusarium pallidorozeum</i> . Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.4).	44

- 15 Atividade da fenilalanina amônia liase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com *Fusarium pallidoroseum*. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P<0,05$ ) (ANEXO 6.6). 45
- 16 Atividade da ascorbato peroxidase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com *Fusarium pallidoroseum*. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P<0,05$ ) (ANEXO 6.5). 46
- 17 Eletroforese revelada para atividade de superóxido dismutase de extratos totais de frutos do meloeiro var. Orange flesh em diferentes dias após inoculação (DAI) com *Fusarium pallidoroseum*. C: controle; T: tratamento com 2 mM de BTH. Setas indicam diferentes isoformas de SOD. 47
- 18 Atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com *Fusarium pallidoroseum*. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P<0,05$ ) (ANEXO 6.7). 48
- 19 Aspecto visual das plantas do melão var. Orange flesh (A) e das folhas secundárias (B) no 6º dia após aplicação dos tratamentos. Os números representam os diferentes tratamentos: C- controle; 0,3; 0,5; 1,0 mM de BTH. 50
- 20 Aspecto visual das folhas primárias e secundárias do melão var. Orange flesh no 8º dia após aplicação dos tratamentos. Os números representam os diferentes tratamentos: C - controle; 0,3; 0,5; 1,0 mM de BTH. 51
- 21 Peso médio das plantas de melão var. Orange flesh coletadas em diferentes tempos após tratamento. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P<0,05$ ) (ANEXO 6.8). 52
- 22 Atividade da peroxidase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamento. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P<0,05$ ) (ANEXO 6.9). 54
- 23 Atividade da fenilalanina amônia liase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamentos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Diferentes letras representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo) ( $P<0,05$ ) (ANEXO 6.11). 55
- 24 Atividade da ascorbato peroxidase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamentos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P<0,05$ ) (ANEXO 6.10). 57

- 25 Eletroforese revelada para atividade de superóxido dismutase de extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh em diferentes dias após tratamento (DAT) com BTH. C: controle; Tratamentos = 0,3, 0,5 e 1,0 mM de BTH. Setas indicam diferentes isoformas de SOD. 58
- 26 Atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamentos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.12). 60

## LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas)	9

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX	Peroxidase do ascorbato
BTH	Benzothiadiazole (= Acibenzolar-S-metil, BION <sup>®</sup> )
BDA	Agar batata-dextrose
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CHI	Quitinase
DAT	Dias após tratamento
DAI	Dias após inoculação
DL	Dose letal
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol bis (b-amino etilenoéter) tetracético
GLU	$\beta$ -1,3-glucanase
i.a.	Ingrediente ativo
NBT	<i>p</i> -nitro blue tetrazolium
PAL	Fenilalanina amônia liase
PIF	Programa Integrado de Frutas
PR	Proteínas relacionada a patogênese
POX	Peroxidase
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SA	Ácido Salicílico
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida
SOD	Dismutases de superóxido
Tris	Hidroximetil aminometano
UAP	Unidade de atividade peroxidásica

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xiii
1. Introdução	1
1.1. <i>Cucumis melo</i>	1
1.2. <i>Fusarium pallidroseum</i>	4
1.3. Defesa vegetal	5
1.3.1 Resposta Hipersensitiva	7
1.3.2. Resposta Sistêmica Adquirida	7
1.3.3. Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-proteínas)	8
1.3.4. Enzimas envolvidas no estresse oxidativo	10
1.3.5. Fenilalanina Amônia Liase	11
1.3.6. Indução de Resistência	11
1.3.6.1. Indução de resistência em pós-colheita	12
1.3.7. Acibenzolar-S-metil (BTH)	15
2. Perguntas Biológicas e Objetivos do trabalho	18
2.1. Objetivos Gerais	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. Materiais	20
3.1. Frutos	20
3.2. Sementes	20
3.3. Fungo	20
3.4. Reagentes químicos	20
4. Métodos	21
4.1. Experimento I: Efeito do BTH na proteção do melão contra a podridão causada pelo <i>F. pallidroseum</i> .	21
4.1.2. Cultivo do fungo e preparação do inóculo	21
4.1.3. Tratamentos e inoculação dos melões	22



4.1.4. Avaliação dos melões	25
4.1.5. Delineamento experimental	25
4.1.6. Determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do BTH contra <i>F. pallidorozeum</i>	25
4.2. Experimento II: Efeito do BTH na indução de enzimas de defesa no melão desafiado pelo <i>F. pallidorozeum</i> .	27
4.2.1. Colheita e desinfecção dos melões	27
4.2.2. Cultivo do fungo e preparação do inóculo	27
4.2.3. Tratamentos e inoculação dos melões	27
4.2.4. Delineamento experimental	28
4.2.5. Preparação dos extratos protéicos	28
4.2.6. Dosagem de proteínas	28
4.2.7. Determinação das atividades enzimáticas nos extratos totais	30
4.2.7.1. Determinação da atividade de Peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)	30
4.2.7.2. Determinação da atividade da Fenilalanina amônia liase (PAL; EC 4.3.1.5)	30
4.2.7.3. Determinação da atividade Ascorbato Peroxidase (APX; EC 1.11.1.11)	30
4.2.7.4. Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)	31
4.2.7.5. Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-Glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)	32
4.3. Experimento III: Efeito do BTH no desenvolvimento e na indução de enzimas de defesa em plantas do melão var. Orange flesh.	33
4.3.1. Condições de plantio	33
4.3.2. Tratamento e coleta das plantas	33
4.3.3. Delineamento experimental	35
4.3.4. Preparação dos extratos protéicos	35
4.3.5. Dosagem de proteínas	35
4.3.6. Determinação das atividades enzimáticas	35
5. Resultados	37
5.1. Efeito do BTH na proteção do melão contra a podridão causada pelo <i>F. pallidorozeum</i> .	37
5.2. Efeito do BTH na indução de enzimas de defesa no melão desafiado pelo <i>F. pallidorozeum</i> .	43
5.3. Efeito do BTH no desenvolvimento e na indução de enzimas de defesa em plantas do melão var. Orange flesh.	49
6. Discussão	61
7. Conclusões	67
8. Referências Bibliográficas	68
9. Anexos	82

## 1. Introdução

### 1.1 *Cucumis melo* L.

O agronegócio mundial de frutas vem aumentando de maneira exponencial na busca por alimentos saudáveis e uma conseqüente melhoria na qualidade de vida. As frutas fazem parte do cardápio diário de muitos povos por terem um sabor especial, baixo teor de calorias e gorduras, riqueza de vitaminas, sais minerais e fibras (FERNANDES, 1998).

O Brasil tem se destacado como importante produtor, consumidor e exportador de frutas, sendo um dos três maiores produtores mundiais. A receita com as exportações de frutas brasileiras em 2005 cresceu 19,3%, passando de US\$ 369 milhões em 2004 para US\$ 440 milhões no ano passado (IBRAF, 2006). Com intuito de elevar os padrões de qualidade e competitividade da fruticultura brasileira ao patamar de excelência requerido pelo mercado internacional, o Ministério de Agricultura e Abastecimento implantou o Programa de Produção Integrada de Frutos (PIF) (ANDRIGUETTO e KOSOSKI, 2003). Este Programa consiste num sistema de produção orientada, de livre adesão por parte dos produtores, cujos procedimentos têm como base as exigências dos mercados importadores, principalmente da Comunidade Européia, rigorosa em requisitos de qualidade e sustentabilidade, enfatizando sempre a proteção do meio ambiente, segurança alimentar, condições de trabalho, saúde humana e viabilidade econômica (VENTURA, 2003).

Dentre as 14 espécies inicialmente contempladas pelo Programa de Produção Integrada de Frutos, o melão destaca-se por sua grande expressão na exportação e contribuição na balança comercial de frutas frescas brasileiras (ANDRIGUETTO e KOSOSKI, 2003).

O melão é uma fruta de baixa caloria e altíssima umidade. Possui baixo teor de proteína e alto conteúdo de carboidratos. É um alimento rico em vitamina A, possui também todo o complexo B e C, cálcio, ferro e fósforo (NEPA, 2006).

Este fruto possui grande popularidade no mundo. Os principais países importadores são os Estados Unidos, Reino Unido, França, Canadá e Alemanha. Os principais exportadores são a Espanha, México, Estados Unidos, Costa Rica e França. O Brasil é o 6º maior exportador de melão, respondendo por cerca de 7%

das exportações mundiais. Neste país, de 2004 a 2005 houve um incremento de 26% no volume de exportação, passando de 142.587 para 179.830 toneladas, no qual a comunidade europeia se destaca como o principal importador do melão brasileiro (CHAVES *et al.*, 2003 IBRAF, 2006).

As vantagens comparativas decorrentes das condições climáticas da região Nordeste e o manejo adequado da irrigação, fertilização e de proteção podem proporcionar o desenvolvimento desta cultura, oferta regular e boa qualidade dos frutos (TAVARES, 2002). Os principais estados produtores de melão no Brasil são o Rio Grande do Norte (Agropólos Açú-Mossoró) e Ceará (Baixo Jaguaribe). Estes dois pólos registram cerca de 80% da produção nacional e mais de 90% das exportações brasileiras de melão (CHAVES *et al.*, 2003).

No Brasil, planta-se principalmente cultivares de melão do grupo Inodorus, tipo “Amarelo”, ocupando cerca de 70% da área cultivada no país. Entretanto, há uma tendência de crescimento do cultivo de melões nobres, como Cantaloupe, Gália, Orange e Charentais, desde a safra 2002/2003 (CHAVES *et al.*, 2003) (Figura 1).

Apesar da grande produção do melão nacional e das boas condições oferecidas pela região Nordeste, as doenças ainda constituem um dos maiores entraves ao desenvolvimento da cultura do melão, sendo de diversas origens, desde aquelas de causa microbiana, passando pelas fisiológicas e nutricionais, até aquelas decorrentes de fatores ambientais. No entanto, as primeiras são as que mais interessam ao produtor, não só pelo seu poder destrutivo, mas, principalmente, pelas conseqüências econômicas negativas que resultam de sua ocorrência, pois podem ser provocadas por uma grande diversidade de agentes patogênicos, como fungos, bactérias, vírus e nematóides (VIANA *et al.*, 2001).



**Figura 1** – Caracterização dos principais tipos comerciais de melão plantados no Brasil (adaptado de Chaves *et al.*, 2003).

Estudos realizados demonstraram que o primeiro fator de estímulo ao consumo de frutos no mundo é a segurança sanitária, entendendo-se como uma necessidade essencial a fruta não apresentar contaminação biológica ou resíduos de produtos químicos (SANHUEZA, 2000). Assim, o cenário mercadológico internacional sinaliza que cada vez mais serão valorizados os aspectos qualitativo e o respeito ao meio ambiente na produção de qualquer produto (ANDRIGUETTO e KOSOSKI, 2003). Na fruticultura, o manejo integrado de doenças tornou-se componente fundamental da produção integrada, buscando produzir com qualidade, reduzindo o uso de agroquímicos, com o objetivo de diminuir a contaminação ambiental, visando a preservação da saúde da população e a sustentabilidade do sistema (ZAMBOLIM, 2002).

O meloeiro apresenta algumas peculiaridades que dificultam o controle fitossanitário, dentre as quais destacam-se o ciclo curto desta cultura, cerca de 60 dias em média, e o plantio de forma escalonada, favorecendo a migração das pragas de uma cultura mais velha para uma recém-plantada (BLEICHER e MELO, 1998; FERNANDES *et al.*, 2000). Esse fato faz com que sejam utilizadas grandes quantidades de defensivos agrícolas para o controle das pragas e doenças. E, esta prática, ao longo do cultivo, empobrece a biodiversidade benéfica à cultura do melão, gera espécies resistentes às substâncias químicas utilizadas, contribui para a contaminação do solo, pela acumulação dos metais pesados, para a contaminação das águas, pela lixiviação e carreamento desses compostos e para a contaminação dos seres vivos, pela bioacumulação ao longo do tempo. Outra grave consequência, é que os frutos, geralmente consumidos “in natura”, podem apresentar altos índices de resíduos de agroquímicos, colocando em risco a saúde do consumidor e dificultando ou até mesmo impedindo a exportação destes produtos, devido às restrições impostas pelos mercados importadores (MENEZES *et al.*, 2000). Portanto, há uma demanda crescente por compostos e estratégias alternativas no controle de doenças.

## 1.2. *Fusarium pallidoroseum*

Apesar da expansão da produção do melão, alguns segmentos da cadeia produtiva são frágeis e pouco estudados, limitando sua exportação, como o da

patologia pós-colheita. Os patógenos em pós-colheita causam grandes transtornos aos varejistas, atacadistas e, principalmente, aos exportadores de frutos, uma vez que os sintomas aparecem no armazenamento e transporte, causando perdas drásticas (SOMMER, 1982 apud TERAÓ, 2003).

Nesse contexto, desde 1999, uma podridão pós-colheita tem sido observada ocorrendo em plantios de meloeiro no Estado do Rio Grande do Norte. A infecção ocorre ainda no campo (pré-colheita), com a penetração ocorrendo na região do corte do pedúnculo. Mesmo após a transferência para as câmaras frias, o patógeno continua a sua patogênese, podendo destruir totalmente o fruto ou causar lesões que afetam sua comercialização (COLARES, 2000). O patógeno associado ao apodrecimento do fruto do meloeiro foi confirmado como sendo o *Fusarium pallidoroseum* (GADELHA, 2002).

Os sintomas, normalmente, iniciam-se na zona de abscisão peduncular de melões, podendo ocorrer também em outra parte do fruto, onde haja algum ferimento. Observa-se, inicialmente, o aparecimento de uma pequena lesão encharcada, acompanhado de intenso crescimento micelial cotonoso branco. Havendo condições ambientais favoráveis, como elevada umidade relativa do ar e temperatura ao redor de 30 °C, observa-se rápida evolução no tamanho da lesão, com aparecimento de fissuras, constituindo-se porta de entrada para saprófitas oportunistas, que colonizam rapidamente, destruindo completamente o fruto.

O *F. pallidoroseum* é um fungo mitospórico, pertencente à subclasse Hyphomycetidae (BARRETO e EVANS, 1988), sendo comumente encontrado no solo e em restos de plantas nas regiões tropicais e subtropicais. Tipicamente, existe como um saprófita, mas pode atuar como patógeno fraco causando deterioração de plantas, podridão de raízes, podridão de frutos pós-colheita ou deterioração de folhas em grande variedade de plantas, podendo também fazer parte de um complexo de doenças com outros fungos e nematóides (BRAYFORD, 2002 apud GADELHA, 2002).

Essa doença tem grande importância devido à dificuldade no controle deste patógeno. Torna-se, então, de extrema importância a busca de novas alternativas para o controle desta doença.

### 1.3. Defesa Vegetal

Plantas são freqüentemente exploradas como fonte de alimento e proteção por ampla variedade de parasitas incluindo vírus, bactérias, fungos, nematóides, insetos e outras plantas. Entretanto, elas têm desenvolvido estratégias para se defenderem contra tais ataques com um arsenal de mecanismos de defesa, através do uso de compostos constitutivos e induzíveis (HUTCHESON, 1998; GACHOMO *et al.*, 2003).

Mecanismos de defesa passivos ou pré-existentes envolvem barreiras estruturais, tais como ceras, celulose, calose, cutina, lignina, compostos antimicrobianos pré-formados, como fitoanticipinas, que previnem a colonização do tecido. Plantas também possuem respostas de defesa ativa que podem ser induzidas por todas as classes de patógenos vegetais e envolvem mecanismos como explosão oxidativa, morte celular rápida e localizada (resposta hipersensitiva), acúmulo de fitoalexinas e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (HUTCHESON, 1998; JEANDET *et al.*, 2002).

Uma resposta de defesa apropriada das plantas vem da percepção de sinais extracelulares e sua transdução dentre as células vegetais. Especificamente para interação plantas e patógenos, este é ainda um fenômeno pouco compreendido, dentro de uma complicada hierarquia de organização biológica. A elucidação desse fenômeno representa uma importante tarefa da patologia vegetal (NIMCHUK *et al.*, 2001).

O fato das defesas ativas serem respostas induzidas indica que as plantas são capazes de reconhecer e responder a estímulos produzidos por um patógeno invasor durante estágios iniciais de patogênese (HUTCHESON, 1998). Molecularmente, sistemas de defesa dependem de uma combinação de uma série específica de genes dominantes R em plantas e uma série correspondente de genes dominantes avirulentos (Avr) no patógeno (KEEN, 1990). Essa estratégia de resistência gene-a-gene fundamenta a base molecular do sistema de defesa vegetal. Ela foi originalmente proposta por Flor (1955) e, de acordo com ela, se uma planta possui gene de resistência (R) dominante correspondente ao gene de avirulência (Avr) dominante do patógeno, a interação é dita incompatível e a doença não se desenvolve; se a planta possui gene R não correspondente ao gene Avr, a interação é compatível e a infecção progride (HAMMERSCHMIDT, 1999). Numa certa interação planta-patógeno, freqüentemente mais de uma específica combinação de

genes R e Avr estão envolvidas e essas múltiplas combinações refletem a complexidade dos mecanismos de defesa.

### 1.3.1. Resposta Hipersensitiva

A resposta hipersensitiva (HR, do inglês “Hypersensitive Response”) é caracterizada pela morte de células e tecidos localizados no sítio de infecção (VAN LOON, 1997). Como resultado, o patógeno permanece confinado na região necrótica próximo ao sítio de infecção (FRITIG *et al.*, 1998). Várias mudanças morfológicas, fisiológicas e moleculares têm sido identificadas em HR. A produção de fitoalexinas, o aumento rápido e transitório de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “Reactive Oxygen Species”), indução de enzimas hidrolíticas, de proteínas relacionadas à patogênese, de inibidores de proteases e deposição de lignina e calose na parede celular da planta são alguns dos eventos relacionados com esta resposta (STINTZI *et al.*, 1993).

### 1.3.2. Resposta Sistêmica Adquirida

Resistência sistêmica adquirida (SAR, do inglês “Systemic Acquired Resistance”) é um tipo de mecanismo de defesa ativado em plantas quando estas estão sendo desafiadas por diversas classes de patógenos. Através dela, a planta protege-se contra um amplo espectro de patógenos (HEIL e BOSTOCK, 2002). SAR, também, pode ser induzida por diversos tipos de elicitores, que podem ser biológicos, químicos e físicos (TERRY e JOYCE, 2004). Essa indução de SAR será discutida mais adiante.

A detecção de aumento de ácido salicílico (AS) em folhas e floema levou pesquisadores a acreditarem que este composto poderia ser um sinal sistêmico de SAR (DEMPSEY *et al.*, 1999). Em muitas plantas, SAR é precedida pelo aumento na concentração de AS (DURRANT e DONG, 2004).

Vários eventos estão envolvidos no processo de SAR. Dentre eles, inclui-se aumento da síntese de proteínas relacionadas à patogênese e fitoalexinas, alterações na parede celular, aumento na atividade de várias enzimas e geração



ROS (MATOLEPSZA, 2006). SAR é caracterizada pelo aumento da expressão de um largo número de genes relacionados à patogênese (genes PR). Estes genes são usados como marcadores moleculares de SAR (DURRANT e DONG, 2004).

### 1.3.3. Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-proteínas)

PR – proteínas podem ser definidas como proteínas ausentes ou presentes em pequenas quantidades em plantas saudáveis, mas capazes de acumular-se em largas quantidades após uma infecção. Elas têm sido encontradas em diversas espécies e estão distribuídas em 17 famílias (Tabela 1) (DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999; VAN LOON *et al.*, 2006).

Existem dois mecanismos de ação que as PR – proteínas exercem na defesa vegetal. O primeiro é bloquear diretamente o desenvolvimento de patógenos por hidrólise da parede celular ou por outras atividades antimicrobianas (VAN LOON, 1997). O segundo é liberar, através da ação glucanases e quitinases, elicitores não específicos da parede celular de patógenos e, estes, aumentarem as defesas da planta rapidamente (HAMMERSCHMIDT, 1999). Este trabalho estudou duas PR-proteínas,  $\beta$ -1,3-glucanases e peroxidases.

Peroxidases (POXs) são proteínas de aproximadamente 50 kDa, que estão presentes como múltiplas isoenzimas em tecidos vegetais (JEBARA *et al.*, 2005). Elas são enzimas associadas com processos fisiológicos e bioquímicos como crescimento, formação celular, desenvolvimento de frutos, biossíntese de etileno e resposta a vários estresses (MATAMOROS *et al.*, 2003). Elas participam de processos ligados à parede celular, tais como oxidação de fenóis e lignificação de células vegetais hospedeiras durante a reação de defesa contra agentes patogênicos (DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999). Limitados processo de infecção têm sido correlacionados com atividade peroxidásica (IRITI e FAORO, 2003; BAYSAL *et al.*, 2004; BAYSAL e ZELLER, 2004; LIU *et al.*, 2005; YAO e TIAN, 2005; MALOLEPSZA, 2006)

TABELA 1 – Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas)

<b>Família</b>	<b>Espécie membro</b>	<b>Propriedades</b>
PR-1	Tabaco PR-1a	Desconhecida
PR-2	Tabaco PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinase tipos I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tabaco R	Quitinase tipos I, II
PR-5	Tabaco S	Semelhante a Thaumatina
PR-6	Tomate Inibidor 1	Inibidor de proteinase
PR-7	Tomate P <sub>69</sub>	Endoproteinase
PR-8	Pepino Quitinase	Quitinase tipo III
PR-9	Tabaco “Peroxidase formadora de lignina”	Peroxidase
PR-10	Salsinha PR-1	Semelhante a Ribonucleases
PR-11	Tabaco Quitinase classe V	Quitinase tipo I
PR-12	Rabanete Rs-AFP3	Defensina
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Tionina
PR-14	Cevada LTP4	Proteína de transferência de lipídios
PR-15	Cevada OxOa	Oxalato oxidase
PR-16	Cevada OxOLP	Semelhante a Oxalato oxidase
PR-17	Tabaco PRp27	Desconhecida

Fonte.: VAN LOON *et al.*, 2006.

As propriedades de proteínas do grupo das  $\beta$ -1,3-glucanases têm sido bastante descritas (VAN LONN, 1997). Esse grupo de enzimas possui massa molecular em torno de 35 kDa e numerosas isoformas, diferindo em atividade catalítica, propriedades estruturais, localização celular e padrões de regulação (ESQUERRE-TUGAYE *et al.*, 2000). Há evidências de que as  $\beta$ -glucanases exercem, no mínimo, duas funções no controle de doenças. Elas são capazes de catalizar a degradação de paredes celulares de agentes patogênicos de plantas, já que  $\beta$ -1,3-glucanos são componentes essenciais da parede celular de patógenos e de liberarem oligossacarídeos biologicamente ativos (elicitores e supressores) capazes de regular o estado de imunização da planta (HAHLBROCK *et al.*, 1995). Vários trabalhos correlacionam aumento da expressão destas enzimas com mecanismos de defesa vegetal (ESQUERRE-TUGAYE *et al.*, 2000; BOKSHI *et al.*, 2003; BAYSAL e ZELLER, 2004; BAYSAL *et al.*, 2005; YAO E TIAN, 2005).

#### 1.3.4. Enzimas envolvidas no estresse oxidativo

Um importante mecanismo de defesa vegetal é o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânions superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxilas (-OH) (INZÉ e MONTAGU, 1995).

Quando atacadas por patógenos, plantas ativam uma série de mecanismos que inclui o rápido acúmulo dessas espécies. ROS podem funcionar na defesa vegetal por ação tóxica direta contra o patógeno (PENG e KUÉ, 1992), formação de lignina, produção de fitoalexinas e reação hipersensitiva (VANACKER *et al.*, 2000), o que restringe o desenvolvimento do patógeno (HAMMERSCHIMIDT, 2005).

Quando em excesso, ROS podem resultar em oxidação de proteínas, ácidos graxos insaturados e DNA, causando danos celulares e eventual morte da célula. Mas as plantas têm envolvido eficientes sistemas antioxidante para eliminar e regular a gênese de ROS. Dentre esses sistemas, estão as enzimas antioxidantes incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) e o sistema da glutathiona redutase (SMIRNOFF, 1993). Este trabalhou estudou a atividade da APX e SOD.

As superóxido dismutases (SOD) são um grupo de metaloenzimas que catalisam a conversão de radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Elas estão separadas em três classes, dependendo do metal cofator (Mn, Fe, Cu/Zn) presente no seu sítio ativo. Trabalhos relatam o papel desta enzima na proteção contra estresses oxidativos (SANTOS *et al.*, 2000; MORAN *et al.*, 2003).

Ascorbato peroxidases (APX) são as mais importantes peroxidases em eliminar peróxido de hidrogênio, catalisando a redução do peróxido para água, usando o poder redutor do ascorbato (NOCTOR e FOYER, 1998). As APXs estão frequentemente associadas ao mecanismo de defesa da planta, dada sua capacidade em atuar no mecanismo de detoxificação em situações que envolvem estresse oxidativo (PEIXOTO *et al.*, 1999).

#### 1.3.5. Fenilalanina Amônia Liase

A fenilalanina amônia liase (PAL, do inglês “Phenylalanine ammonia liase”) é a enzima chave do metabolismo de fenilpropanóides, catalisando a formação do ácido *trans*-cinâmico, que é um precursor de vários metabólitos de defesa vegetal (EL-SHORA, 2002; WEN *et al.*, 2005). De fato, a via dos fenilpropanóides é uma das mais importantes vias do metabolismo secundário vegetal, que produz uma variedade de compostos fenólicos relacionados à defesa vegetal. Vários trabalhos relacionam a indução dessa enzima e aumento da defesa vegetal (YAO e TIAN, 2005; WEN *et al.*, 2005; BAYSAL *et al.*, 2005).

#### 1.3.6. Indução de Resistência

A proteção das plantas através da indução de resistência vem se tornando um potente método em substituição ao uso de fungicidas, pois estes agentes químicos de defesa apresentam potencial carcinogênico, toxicidade residual alta e aguda, longo período de degradação e existe a percepção pública que fungicidas são perigosos à saúde humana e ao meio ambiente (JANISICWICZ e KORSTEN, 2002; UNNIKRIISHNAN e NATH, 2002; TRIPATHI e DUBEY, 2004). O desenvolvimento de resistência para fungicidas comumente usados em populações

de patógenos também se tem tornado um problema significativo (REIMANN e DEISING, 2000).

Por outro lado, há substâncias químicas não tóxicas, capazes de induzir vários mecanismos de defesa nas plantas (STICHER *et al.*, 1997). Dentre estes, destacam-se: como elicitores orgânicos naturais, o ácido salicílico (AS) (ZAINURI *et al.*, 2001; YAO e TIAN, 2005), o jasmonato (DROBY *et al.*, 1999; YAO e TIAN, 2005) e a quitosana (FAJARDO *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 2000); como indutores inorgânicos, os fosfonatos (STICHER *et al.*, 1997); e como elicitores sintéticos, o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (WARD *et al.*, 1991; YEDIDIA *et al.*, 2000) e acibenzolar-S-metil (ASM ou BTH) (BOKSHI *et al.*, 2003; SOYLU *et al.*, 2003; BAYSAL e ZELLER, 2004; TERRY e JOYCE, 2004). Estes indutores químicos modificam a interação planta-patógeno para assemelhar-se a uma interação incompatível, com mecanismos relacionados à defesa sendo induzidos antes do desafio (STICHER *et al.*, 1997).

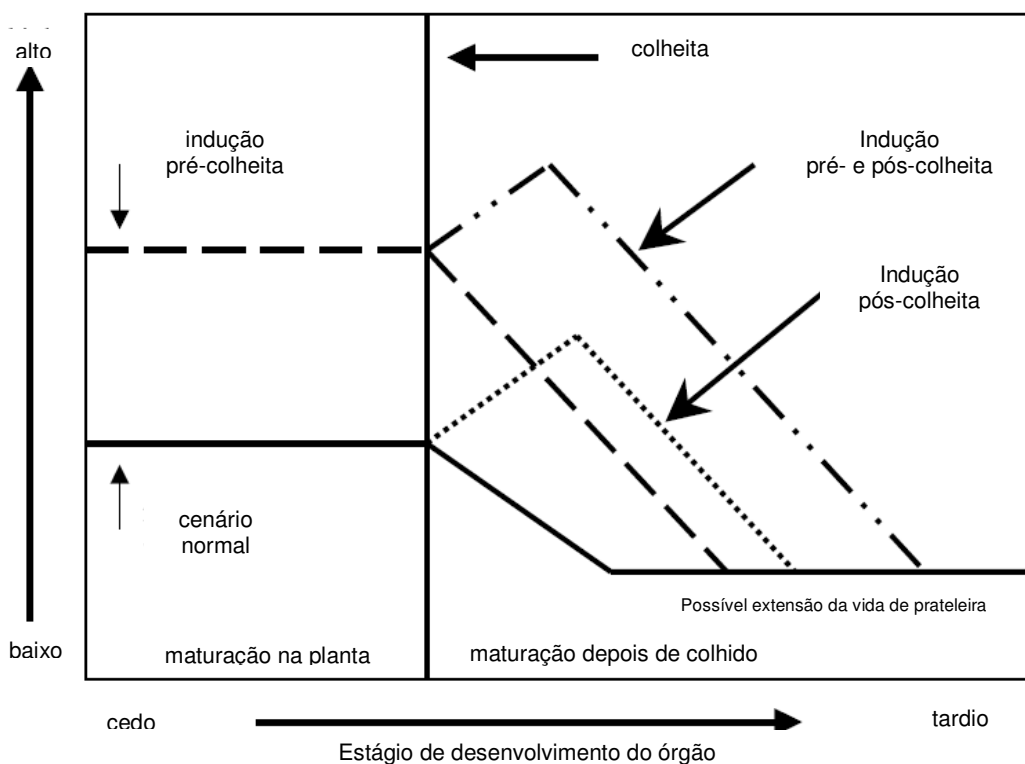
Muitos trabalhos na literatura têm demonstrado a capacidade de elicitores químicos induzirem SAR. Entretanto, algumas informações podem ter sido ocultadas em decorrência de indutores de SAR terem sido fracos ou ineficazes. Assim, é importante que aumentem as pesquisas sobre como resistência natural e SAR podem ser manipuladas em diferentes espécies vegetais, em diferentes ambientes e frente a uma série de práticas de manejo de culturas (TERRY e JOYCE, 2004).

#### 1.3.6.1. Indução de resistência em pós-colheita

Durante o desenvolvimento de órgãos vegetais e após sua colheita, a resistência natural às doenças geralmente diminui, levando à infecção, doença e, por último, à morte. Na horticultura, doenças pós-colheita, causadas por fungos, normalmente iniciam-se ou com infecções latentes ou por injúrias ocorridas durante a colheita e manuseio. O declínio de resistências naturais pode ativar essas infecções quiescentes e aumentar sua incidência e severidade (TERRY e JOYCE, 2004). Consideráveis perdas pós-colheita de frutas e vegetais ocorrem devido a podridões causadas por fungos patogênicos. Frutas, devido ao seu baixo pH, elevada umidade e quantidade de nutrientes, são muito susceptíveis ao ataque de patógenos (TRIPATHI e DUBEY, 2004)

Fungicidas são o primeiro meio para o controle de perdas pós-colheita, existindo uma grande probabilidade de exposição humana direta aos químicos (TRIPATHI e DUBEY, 2004). Portanto, durante as últimas décadas, muitas tentativas têm sido feitas para desenvolver métodos não-fungicidas para controlar podridões pós-colheita de várias mercadorias (JANISICWICZ e KORSTEN, 2002). Estas incluem modificações do ambiente, tal como o estoque de espécies vegetais a temperaturas que suprimem o desenvolvimento do patógeno, modificação da umidade e atmosfera, tratamento térmico (LURIE, 1998; SCHIRRA *et al.*, 2000) e indução de resistência por aplicação de irradiação UV (GONZALEZ-AGUILAR *et al.*, 2001; MARQUENIE *et al.*, 2002) ou elicitores (TERRY e JOYCE, 2004).

O aumento da proteção de tecidos vegetais hospedeiros, durante períodos de susceptibilidade através de resistência adquirida, é considerado uma estratégia preferida para obter-se um manejo integrado de pestes (KUÉ, 2000) (Figura 2).



**Figura 2** - Modelo esquemático demonstrando níveis e padrões de mudanças de substâncias (relacionadas à resistência natural a doenças) pré-formadas e induzíveis, durante a maturação do fruto na planta e depois de colhido não induzido e induzido em diferentes etapas (adaptado de TERRY e JOYCE, 2004).

### 1.3.7. Acibenzolar-S-metil (BTH)

O acibenzolar-S-metil (BTH) é um ativador de plantas do grupo químico dos benzotriazolóis, que foi lançado em 1996 na Alemanha e, atualmente, tem registro em vários países como um promotor de culturas saudáveis, com o nome comercial de Bion® ou Actigard™ (SOYLU *et al.*, 2003), com registro no Brasil (SILVA e RESENDE, 2001).

BTH é conhecido como um análogo estrutural e funcional do ácido salicílico (Figura 3), devido a estes compostos serem capazes de induzir respostas de defesa semelhantes em algumas espécies vegetais (FRIEDRICH *et al.*, 1996; TERRY e JOYCE, 2004), porém, interessante, estudos mostraram evidências de que a indução da expressão de genes SAR pelo BTH não requer a contribuição de AS, sugerindo que este composto age como um mensageiro secundário, em uma etapa de sinalização à frente do ácido salicílico, capaz de ativar a via de transdução de SAR independente da acumulação de outras moléculas sinais (LAWTON *et al.*, 1996).

BTH tem sido usado com sucesso para induzir resistência em diversas espécies vegetais contra um amplo espectro de patógenos: bactérias (SOYLU *et al.*, 2003; SPARLA *et al.*, 2004); vírus (ANFOKA, 2000); fungos (BOKSHI *et al.*, 2003; IRITI e FAORO, 2003; BAYSAL e ZELLER, 2004; MATOLEPSZA, 2006); insetos (CORREA *et al.*, 2005); nematóide (OWEN *et al.*, 2002).

Análises bioquímicas de reações de defesa celular induzida por BTH têm demonstrado rápida expressão de genes relacionados à resistência, como genes de glucanases e quitinases (BOKSHI *et al.*, 2003; BUZI *et al.*, 2004). Aumento das atividades de peroxidase, fenilalanina amônia liase e chalcona isomerase, bem como acumulação de lignina, fitoalexinas e outros compostos fenólicos têm sido também reportados (BENHAMOU e NICOLE, 1999; SOYLU *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2005). Como um análogo do AS, BTH também demonstrou capacidade de inativar catalase e ascorbato peroxidase (WENDEHENNE *et al.*, 1998).

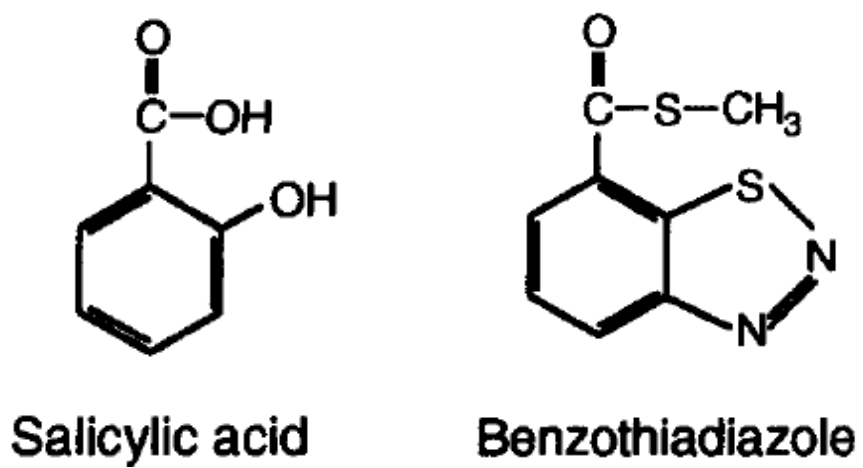
Apesar da ação indutora do BTH em várias culturas, são poucos os trabalhos em pós-colheita e, em menor quantidade, os realizados com a cultura do melão.

Com relação à proteção da saúde humana, estudos realizados em animais de laboratórios, com administração do BTH por via oral, mostraram que 90%



do produto ingerido é rapidamente absorvido pelo trato gastro-intestinal, prontamente metabolizado e excretado (cerca de 90% pela urina e 5% pelas fezes). Este produto apresenta baixa toxicidade (DL50 oral em ratos > 5.000 mg/kg), e nenhum efeito carcinogênico, mutagênico ou teratogênico. Quanto aos efeitos crônicos, quando utilizado em doses altas (200 mg/dia), no animal mais sensível, o cão, provocou efeitos adversos, como leve depressão no ganho de peso, anemia hipocrômica, toxicidade no fígado moderada, etc (RUESS *et al.*, 1996; SYNGENTA, 2006).

Quanto aos cuidados de proteção ao meio ambiente, o BTH é considerado um produto medianamente tóxico ao meio ambiente (CLASSE III), portanto deve-se evitar a contaminação ambiental (SYNGENTA, 2006).



**Figura 3** – Comparação das estruturas dos indutores de respostas de defesa vegetal, ácido salicílico e acibenzolar-S-metil (BTH).

## 2. Perguntas Biológicas e Objetivos do Trabalho

Sabendo que as plantas possuem diferentes mecanismos bioquímicos que podem contribuir para sua defesa, que o BTH tem a capacidade de proteger diversas culturas vegetais contra o desafio de um amplo espectro de patógenos e que o *F. pallidoroseum* é um importante patógeno para a cultura do meloeiro, surgem as perguntas biológicas que nortearam o presente trabalho:

“Será que o BTH atua na indução da defesa do melão var. Orange flesh, conferindo-lhe resistência à podridão causada pelo *Fusarium pallidoroseum* e este mecanismo envolve a expressão de enzimas relacionadas com a defesa dos frutos?”

“Será que o BTH é capaz de alterar os padrões de enzimas relacionadas com a defesa da planta do melão var. Orange flesh?”

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a capacidade do BTH em induzir resistência do melão var. Orange flesh contra o desenvolvimento da podridão causada pelo *F. pallidoroseum* e correlacionar a ação deste elicitor com a expressão de enzimas envolvidas com a defesa vegetal.

Avaliar a capacidade do BTH em alterar os padrões de enzimas relacionadas com a defesa da planta do melão var. Orange flesh.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade do BTH conferir resistência ao melão var. Orange flesh contra a podridão causada pelo *F. pallidoroseum*;
- Avaliar a habilidade do BTH em alterar a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e da fenilalanina amônia liase no sistema melão var. Orange flesh x *F. pallidoroseum*;
- Avaliar a capacidade do BTH em alterar a expressão de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo no sistema melão var. Orange flesh x *F. pallidoroseum*;

- Avaliar a habilidade do BTH em alterar a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e da fenilalanina amônia liase no meloeiro var. Orange flesh;
- Avaliar a capacidade do BTH em alterar a expressão de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo no meloeiro var. Orange flesh;

### 3. Materiais

#### 3.1. Frutos

Os frutos do meloeiro var. Orange flesh foram obtidos da Empresa Potyfrutas – Mossoró – RN.

#### 3.2. Sementes

Sementes de melão var. Orange flesh foram obtidas de frutos adquiridos comercialmente em supermercado de Fortaleza-CE.

#### 3.3. Fungo

O fungo *Fusarium pallidoroseum* foi obtido do Laboratório de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza – CE.

#### 3.4. Reagentes Químicos

Albumina sérica bovina (BSA), azul brilhante de coomassie, L-fenilalanina, *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), guaiacol, laminarina (oriunda da *Laminaria digitata*), *p*-nitro blue tetrazolium (NBT) e riboflavina foram obtidos da Sigma Co., St. Louis, USA.

Meios de cultura ágar batata dextrose (BDA) e levedura-peptona-dextrose (YPD, do inglês Yeast Peptone Dextrose) foram obtidos da Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA.

Acibenzolar-S-metil (BTH, formulação granulada dispersível, com 50% de ingrediente ativo, Bion<sup>®</sup>) foi obtido da Syngenta, Brasil.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 4. Métodos

O presente trabalho foi realizado em três experimentos independentes, denominados de experimentos I, II e III.

O primeiro experimento foi realizado com base na seguinte pergunta: *Sendo o BTH um agente protetor de espécies vegetais contra patógenos, seria ele eficaz na proteção do melão contra o *F. pallidorozeum*?*

**4.1. Experimento I:** Avaliação do efeito do BTH na proteção do melão contra a podridão causada pelo *F. pallidorozeum*.

### 4.1.1. Colheita e Desinfecção dos melões

Os melões var. Orange flesh foram colhidos ao acaso no campo, no período quente e seco, em uma plantação comercial. Os frutos foram selecionados pela homogeneidade no tamanho, ponto de maturação e ausência de injúrias. Depois de colhidos, foram acondicionados em caixas de plástico e transportados para a sede da EMBRAPA, Fortaleza-CE, em temperatura ambiente. Ao chegarem, os frutos foram lavados com água corrente e, em seguida, borrifados com etanol 70%, para desinfecção dos mesmos.

### 4.1.2. Cultivo do fungo e preparação do inóculo

O fungo *F. pallidorozeum* foi mantido em meio ágar batata-dextrose (BDA) a 28 °C. Estas condições são ideais para o crescimento micelial e esporulação deste fungo (TERAO, *et al.*, 2003). A suspensão de esporos foi obtida de culturas frescas, de 7 dias após repicagem do fungo, e a concentração final ajustada para 10<sup>5</sup> esporos/mL.

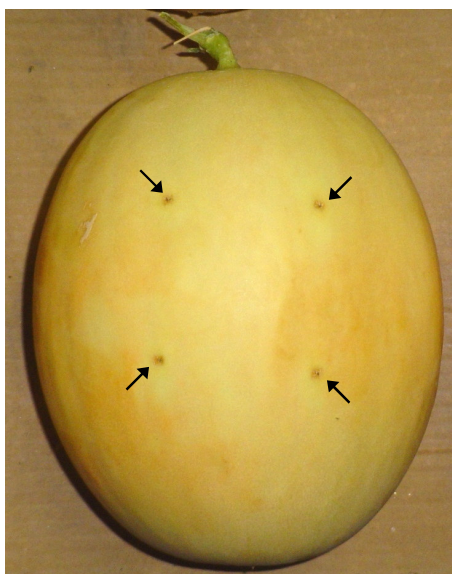
Para preparação do meio de cultura, 39 g de BDA foram ressuspensos em água grau Milli-Q, q.s.p. 1 L, em banho-maria, com água em ebulição. A seguir, o

meio foi autoclavado (121 °C, 15 minutos, 1,5 atm) e distribuído (cerca de 20 mL) em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Na preparação da suspensão de esporos, placas contendo culturas de 7 dias foram lavadas com 5 mL de água destilada estéril e os esporos desprendidos com auxílio de uma alça de Drigalsky. Em seguida, essa suspensão foi filtrada em gaze estéril e os esporos contados em câmara de Neubauer.

#### 4.1.3. Tratamentos e inoculação dos melões

Os frutos foram tratados através de um mergulho, por 10 minutos, em soluções de BTH nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 mM (de ingrediente ativo – i.a.) e secos ao ar. O grupo controle foi mergulhado em água. Todas as soluções continham 0,05% de Tween 80 para auxiliar na solubilização do produto, bem como na sua aderência ao fruto. As concentrações escolhidas para realização deste experimento foram baseadas em diversos trabalhos realizados com indução de resistência através do BTH (BOKSHI, *et al.*, 2003; LIU, *et al.*, 2005; YAO e TIAN, 2005) e também de acordo com testes preliminares realizados com este elicitor e melão, no qual se observou que concentrações superiores às testadas neste trabalho são de difícil solubilização do produto.

Após o tratamento, os frutos foram distribuídos em caixas de papelão (4 frutos por caixa). Após 60 horas do tratamento, os melões foram feridos em quatro pontos da sua superfície (Figura 4) com um furador construído com seis agulhas (capaz de perfurar cerca de 3 mm de profundidade e 2 mm de diâmetro) e 20  $\mu$ L da suspensão de esporos de *F. pallidoroseum* na concentração de  $1 \times 10^5$  esporos/mL foram inoculados em cada ferida. Após inoculação, as caixas contendo os frutos foram envoltas por 24 horas com um saco plástico com objetivo de elevar a umidade do ambiente, a fim de garantir a penetração do fungo. (Figura 5). Durante todo o experimento, os frutos foram armazenados sob temperatura controlada de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ .



**Figura 4** – Fruto do meloeiro var. Orange flesh ferido em quatro pontos. Setas indicando os ferimentos.





**Figura 5** – Caixas ensacadas após inoculação: (A) caixa representando uma unidade experimental do Experimento I e (B) figura mostrando todos os tratamentos.

#### 4.1.4. Avaliação dos melões

Os melões foram avaliados diariamente quanto à incidência e severidade da doença.

A avaliação da incidência foi feita pela contagem do número de lesões apresentando doença em cada fruto. A severidade foi analisada através do tamanho da lesão, somando-se as medidas do diâmetro das lesões em cada fruto com o auxílio de uma régua milimetrada.

#### 4.1.5. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo a unidade experimental correspondente a uma caixa com quatro frutos (Figura 6). A análise de variância foi realizada pelo programa estatístico SANEST e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

#### 4.1.6. Determinação da atividade antifúngica *in vitro* do BTH contra *F. pallidoroeseum*

O ensaio de inibição de crescimento micelial foi realizado de acordo com Brockaert *et al.* (1990) modificado para as condições experimentais. Este ensaio foi realizado em placa de 96 micropoços. Em cada poço foram adicionados 0,1 mL de meio YPD e 0,01 mL de uma suspensão de esporos de *F. pallidoroeseum* ( $2 \times 10^5$  esporos/mL). Logo após, 0,09 mL de solução de BTH em diferentes concentrações (0,1, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0 e 5,0 mM) foram colocado em cada poço. Água grau Milli-Q estéril e solução de peróxido de hidrogênio 0,1 M foram adicionadas em diferentes poços como controle positivo e negativo, respectivamente. Leituras de absorbância a 630 nm foram realizadas em uma leitora de ELISA (“Automated Microplate Reader, modelo ELX800-Bio-Tek Instruments<sup>®</sup>, Inc.) em diferentes tempos: 24, 36, 48, 60 e 72 horas.



**Figura 6** – Caixa representando uma unidade experimental do Experimento I.

#### 4.2. **Experimento II:** Efeito do BTH na indução de enzimas de defesa em frutos do meloeiro var. Orange flesh desafiado pelo *Fusarium pallidoroseum*.

Um segundo experimento foi realizado com o objetivo de saber se este indutor ativaria respostas de defesa do fruto. Portanto este experimento foi conduzido com base na seguinte pergunta biológica: *Sendo o BTH um ativador de defesa vegetal contra patógenos, seria ele capaz de alterar os padrões de enzimas relacionadas com a defesa do melão desafiado pelo *F. pallidoroseum*?*

##### 4.2.1. Colheita e desinfecção dos melões

Procedeu-se como descrito no sub-item 4.1.1.

##### 4.2.2. Cultivo do fungo e preparação do inóculo

O mesmo procedimento do sub-item 4.1.2 foi empregado.

##### 4.2.3. Tratamentos e inoculação dos melões

Neste experimento, os frutos foram tratados através de um mergulho por 10 minutos em solução de BTH na maior concentração utilizada no 'Experimento I' (2,0 mM (i.a.)). O grupo controle foi mergulhado em água. As duas soluções continham 0,05% de Tween 80. Após o tratamento, os frutos foram distribuídos em caixas de papelão (6 frutos por caixa). Após 60 horas do tratamento, os melões foram feridos em quatro pontos eqüidistantes da sua superfície com um furador construído com seis agulhas (capaz de perfurar cerca de 3 mm de profundidade e 2 mm de diâmetro) e 20  $\mu$ L da suspensão de esporos de *F. pallidoroseum* na concentração de  $1 \times 10^5$  esporos/mL foram inoculados em cada ferida. Após inoculados, as caixas contendo os frutos foram envoltas por 24 horas com um saco plástico com objetivo de elevar a umidade. Após 3, 7 e 10 dias da inoculação do fruto com o fungo, amostras de 1 cm de profundidade, abrangendo casca e polpa, foram coletadas com auxílio de um furador de aço de 2 cm de diâmetro. As amostras

foram coletadas junto às áreas de lesão e, em seguida, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (- 84°C) (Figura 7). Durante todo o experimento, os frutos foram armazenados sob temperatura controlada de 25 °C ± 2.

#### 4.2.4. Delineamento experimental

Neste experimento, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 2 (tempo x tratamentos) com 3 repetições, sendo a unidade experimental correspondente a uma caixa com 6 frutos. A análise de variância foi realizada pelo programa estatístico SANEST e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

#### 4.2.5. Preparação dos extratos protéicos

Amostras de tecido de melão, coletadas como descrito no sub-ítem 4.2.3, foram maceradas em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,15 M, na proporção de 1:1 (m/v), por 10 minutos, em geral, sob banho de gelo. Após maceração, a suspensão foi filtrada em pano de trama fina e centrifugada (20.000 x g, 4 °C, 20 minutos). Feita a centrifugação, o sobrenadante foi dialisado por 72 horas, a 4 °C, contra o tampão de extração. Esta preparação foi denominada extrato total e estocada em freezer (-20°C) para determinações de proteínas e atividades enzimáticas.

#### 4.2.6. Dosagem de proteínas

A determinação dos teores de proteínas foi feita seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a alíquotas de 0,1 mL dos extratos totais. Após 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram feitas a 595 nm, em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). Albumina sérica bovina foi utilizada em doses crescentes (50 – 500 ug/mL) para obtenção de uma curva padrão e definição do fator de correção, necessário para determinar o teor de proteínas solúveis nos extratos.



**Figura 7** – Forma de coleta das amostras dos frutos: (A) corte do fruto com furador e (B) detalhe da amostra, padronizadas para 1 cm de profundidade.

#### 4.2.7. Determinação das atividades enzimáticas nos extratos totais

##### 4.2.7.1. Determinação da atividade de peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)

Para determinação da atividade peroxidásica foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991). Guaiacol foi utilizado como substrato doador de prótons e peróxido de hidrogênio como receptor. A mistura reacional consistiu de alíquotas de 0,020 mL do extrato total, 0,980 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 0,5 mL de guaiacol 0,02 M e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 0,06 M. A mistura foi incubada a 30 °C, por 3 minutos e, em seguida, a leitura da absorbância do composto colorido formado, 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona (DOERGE *et al.*, 1997) foi medida a 480 nm (espectrofotômetro Novaspec III da Pharmacia). A variação de 1,0 unidade de absorbância por minuto foi assumida como 1,0 unidade de atividade peroxidásica, sendo esta expressa em unidades de atividade por grama de massa de tecido fresco (UA/g MF).

##### 4.2.7.2. Determinação da atividade da fenilalanina amônia liase (PAL; EC 4.3.1.5)

A atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) foi determinada segundo método descrito por El-Shora (2002) e Mori *et al.* (2001). A mistura reacional consistiu de 0,2 mL do extrato total, 0,2 mL de L-fenilalanina 0,04 M, 0,02 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05 M, 0,48 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8. Essa mistura foi incubada por 1 hora, a 30 °C. A reação foi parada pela adição de 0,1 mL de HCl 6 M. O ensaio consistiu na medida da quantidade de ácido trans-cinâmico produzido, a partir da desaminação da fenilalanina. Para isso, leituras de absorbância a 290 nm foram medidas, transformadas e expressas em picomol de ácido trans-cinâmico produzido por grama de massa fresca por segundo. A atividade da PAL foi determinada utilizando-se uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de ácido trans-cinâmico (0,01 – 0,1  $\mu$ g ácido trans-cinâmico/mL).

##### 4.2.7.3. Determinação da atividade ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11)

A atividade da Peroxidase do ascorbato foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), modificada por Koshiha (1993), conforme descrito por Peixoto *et al.* (1999), adaptada para as condições experimentais. A mistura reacional consistiu de 600  $\mu\text{L}$  do tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,0, contendo 0,5 mM de ascorbato, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM e 300  $\mu\text{L}$  do extrato total. O decréscimo da leitura de absorvância medida a 290 nm, no intervalo de 10 - 180 segundos, foi mensurado como índice de oxidação do ascorbato. A variação de 1,0 unidade de absorvância por minuto foi assumida como 1,0 unidade de atividade ascorbato peroxidásica, sendo esta expressa em unidades de atividade por grama de massa de tecido fresco (UA/g MF).

#### 4.2.7.4. Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)

A atividade de SOD foi revelada em gel de eletroforese unidimensional segundo a metodologia descrita por Martinez *et al.* (2001), na qual foi avaliada a capacidade desta enzima para inibir a redução fotoquímica do NBT por radicais superóxido gerados fotoquimicamente (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

A corrida eletroforética, em gel de poliacrilamida, foi realizada em condições nativas de acordo com a metodologia descrita por Davis (1964) e Ornstein (1964). O gel de aplicação (1 mm de espessura) continha 3,5% de acrilamida, preparada em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8, e o gel de separação (1 mm de espessura), na concentração de 12,5% de acrilamida, preparada em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Para a análise, extratos das coletas 3, 7 e 10 dias após inoculação dos frutos foram utilizados. Alíquotas contendo 4,5  $\mu\text{g}$  de proteínas oriundas de extratos totais foram preparadas em tampão de amostra 4x concentrado (5,0 mL de tampão Tris-HCl, 1,0 M, pH 6,8, 5,04 g de glicerol, 0,04 mL de EDTA 0,5 M, 0,1 mL de EGTA 0,2 M, 6,0 mL azul de bromofenol 0,1% e água destilada, q.s.p. 10 mL) e aplicadas no gel. A corrida foi desenvolvida a 20 mA, por placa, por aproximadamente 90 minutos.

Ao término da corrida eletroforética, o gel foi lavado com tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,8 (2 x 15 minutos). Em seguida, foi incubado com uma solução contendo NBT a 0,25 mg/mL e riboflavina 0,1 mg/mL em água destilada e



exposto à luz (lâmpada fluorescente circular 32 W). A atividade de SOD em gel foi visualizada como bandas acromáticas em um fundo azulado.

#### 4.2.7.5. Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)

A atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada segundo o método descrito por Boller (1993) e medida em função da velocidade de formação de glucose a partir da degradação da laminarina, usada como substrato. A solução de laminarina (2,0 mg/L) foi dissolvida em água grau Milli-Q, aquecida a 60 °C, por 10 minutos e, em seguida, dialisada exaustivamente contra água grau Milli-Q para remoção da glucose livre.

No ensaio, 0,1 mL de extrato total foi incubado com 0,9 mL da solução de laminarina, a 50 °C, por 30 minutos. A seguir, 1,0 mL da solução “D” [1,0 mL da solução “B” [(15,0 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0,02 mL de ácido sulfúrico concentrado e água grau Milli-Q q.s.p. 100 mL) mais 25 mL da solução “A” (25,0 g de carbonato de sódio anidro, 25,0 g de tartarato de sódio e potássio, 20,0 g de bicarbonato de sódio, 200,0 g de sulfato de sódio anidro e água grau Milli-Q q.s.p. 1000 mL)], preparada no momento do ensaio, foram adicionados e a mistura aquecida a 98 °C, em banho-maria, por 20 minutos. Após resfriamento em água corrente, por 5 minutos, 1,0 mL da solução “C” [3,0 g de arseniato de sódio e água grau Milli-Q, q.s.p. 25,0 mL] foi acrescentado e, logo em seguida, os tubos agitados vigorosamente em vortex até a completa remoção dos gases formados na reação. Leituras de absorbância em 520 nm foram feitas e a quantidade de monômeros de glucose liberados foi determinada utilizando-se uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de glucose, variando de 7,5 a 240  $\mu$ g/mL, em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. A atividade  $\beta$ -1,3-glucanásica foi expressa em nanokatal por grama de massa de tecido fresco (nkat/g/MF), onde 1,0 nkat equivale a 1,0 nmol de glucose liberado por segundo, nas condições do ensaio.

**4.3. Experimento III:** Efeito do BTH no desenvolvimento e na indução de enzimas de defesa em plantas do melão var. Orange flesh.

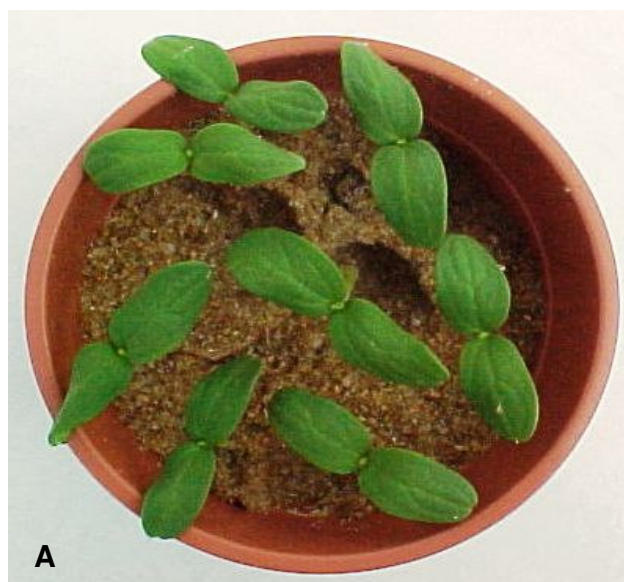
O terceiro experimento foi realizado com base na seguinte pergunta: *Sendo o BTH um indutor de respostas de defesa, seria ele capaz de alterar os padrões de enzimas relacionadas com a defesa da planta do melão?*

#### 4.3.1. Condições de plantio

Sementes obtidas de frutos maduros de melão var. Orange flesh foram colocadas para germinar em vasos de plástico de 10 cm de altura e 12 cm de diâmetro, contendo oito sementes em cada vaso. O substrato utilizado foi areia do leito de rio, exaustivamente lavada com água de torneira, seguida de água destilada e autoclavada três vezes, por um período de 30 minutos, a 120 °C, 1,5 KGF. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, a 27-35 °C. As plantas foram regadas diariamente com água destilada até o 6º dia após o plantio e, após, com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada de acordo Silveira *et al.* (2001).

#### 4.3.2. Tratamento e coleta das plantas

Os tratamentos foram aplicados após 8 dias de plantio. Plântulas que apresentavam folhas primárias totalmente expandidas (Figura 8) foram borrifadas com 300 uL de soluções de BTH nas concentrações de 0,3, 0,5 e 1 mM (i.a.). Plantas controles foram borrifadas com água. Seis plantas de cada vaso (selecionadas pela homogeneidade no tamanho e aspecto morfológico) foram coletadas 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias após tratamentos (DAT). Após coleta, estas foram lavadas com água destilada, secadas em papel toalha e pesadas. Por fim, as folhas secundárias foram destacadas das plantas e congeladas a -20 °C para análises posteriores. As dosagens enzimáticas (descritas posteriormente) foram realizadas nas folhas secundárias para se analisar a capacidade de indução de defesa sistêmica pelo BTH, já que, no dia do tratamento, as plantas estavam iniciando a formação das folhas secundárias (Figura 8).



**Figura 8** – Estado da planta do meloeiro var. Orange flesh no dia do tratamento: (A) vaso representando uma repetição; (B) detalhe do estado da planta no dia do tratamento.

As concentrações escolhidas para realização deste experimento foram baseadas em diversos trabalhos realizados com indução de resistência com BTH em melão (SMITH-BECKER *et al.*, 2003; RIZZO *et al.*, 2003; HUANG, *et al.*, 2000).

#### 4.3.3. Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento blocos ao acaso em fatorial tipo 7 x 5 (tempo x tratamentos), com 3 repetições, sendo cada repetição representada por 6 plantas. A análise de variância foi realizada pelo programa estatístico SANEST e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

#### 4.3.4. Preparação dos extratos protéicos

As folhas secundárias foram maceradas em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,15 M, na proporção de 1:3 (m/v), por 10 minutos, em gral, sob banho de gelo. Após maceração, a suspensão foi centrifugada (20.000 x *g*, 4 °C, 10 minutos). Feita a centrifugação, o sobrenadante foi dialisado por 72 horas, a 4 °C, contra o tampão de extração. Esta preparação foi denominada extrato total e estocada em freezer (-20 °C) para determinações de proteínas e atividades enzimáticas.

#### 4.3.5. Dosagem de proteínas

Realizado como descrito no sub-item 4.2.6.

#### 4.3.6. Determinação das atividades enzimáticas

A determinação e expressão das atividades das enzimas peroxidase, fenilalanina amônia liase, peroxidase de acorbato, superóxido dismutase e  $\beta$ -1,3-glucanase foram feitas como descrito nos sub-itens 4.2.7.1, 4.2.7.2, 4.2.7.3, 4.2.7.4 e 4.2.7.5, respectivamente.

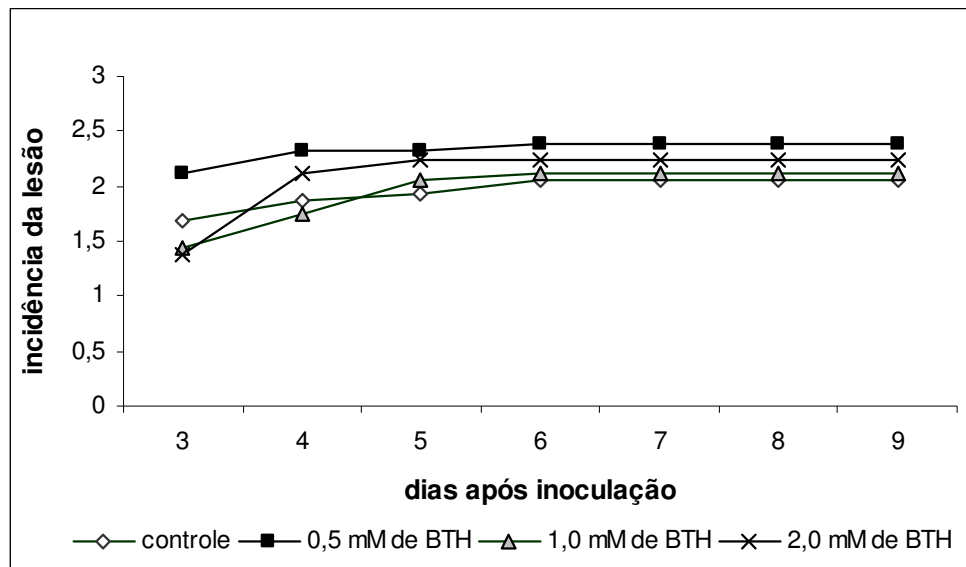
## 5. Resultados

### 5.1. Avaliação dos efeitos do BTH na proteção do melão contra a podridão causada pelo *F. pallidoroseum*.

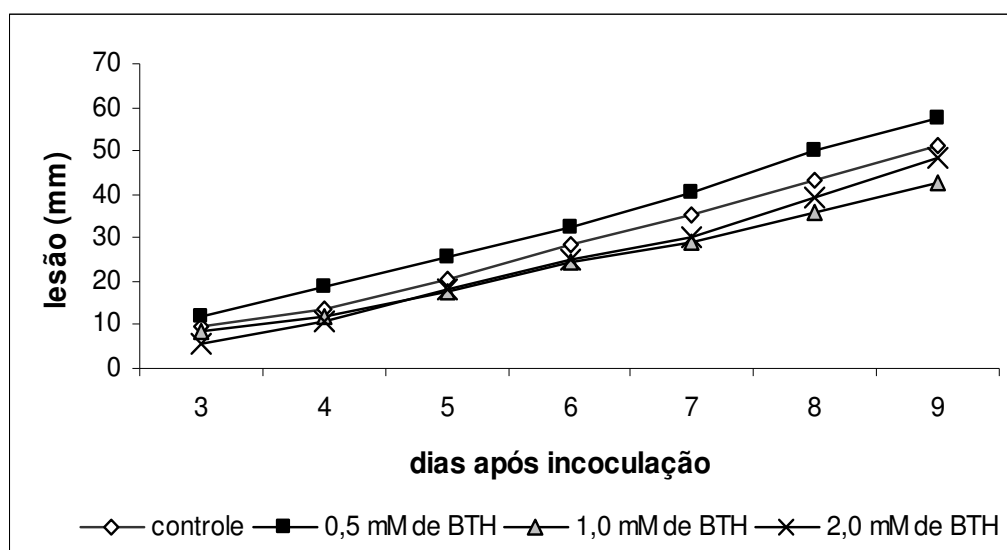
Neste experimento foi possível avaliar a capacidade do BTH nas concentrações 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM em controlar a incidência e a severidade da doença causada pelo *F. pallidoroseum*.

A incidência da doença, medida através do número de lesões com doença, não foi reduzida em nenhuma das concentrações de BTH utilizadas, quando comparada com o tratamento controle (Figura 9). A severidade da doença, medida através do tamanho da lesão causada pelo patógeno, também não foi reduzida nos diversos tratamentos com BTH (Figuras 10, 11 e 12).

Quanto a capacidade do BTH em inibir o crescimento do *F. pallidoroseum*, as diversas concentrações de BTH (0,1, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, e 5,0 mM) não foram capazes de inibir o crescimento do fungo, nos diversos tempos de análise (Figura 13). Além dessa observação, pode-se notar que na maior concentração de BTH houve um maior crescimento do fungo nos tempo 60 e 72 horas, quando comparado com o controle (fungo com água).

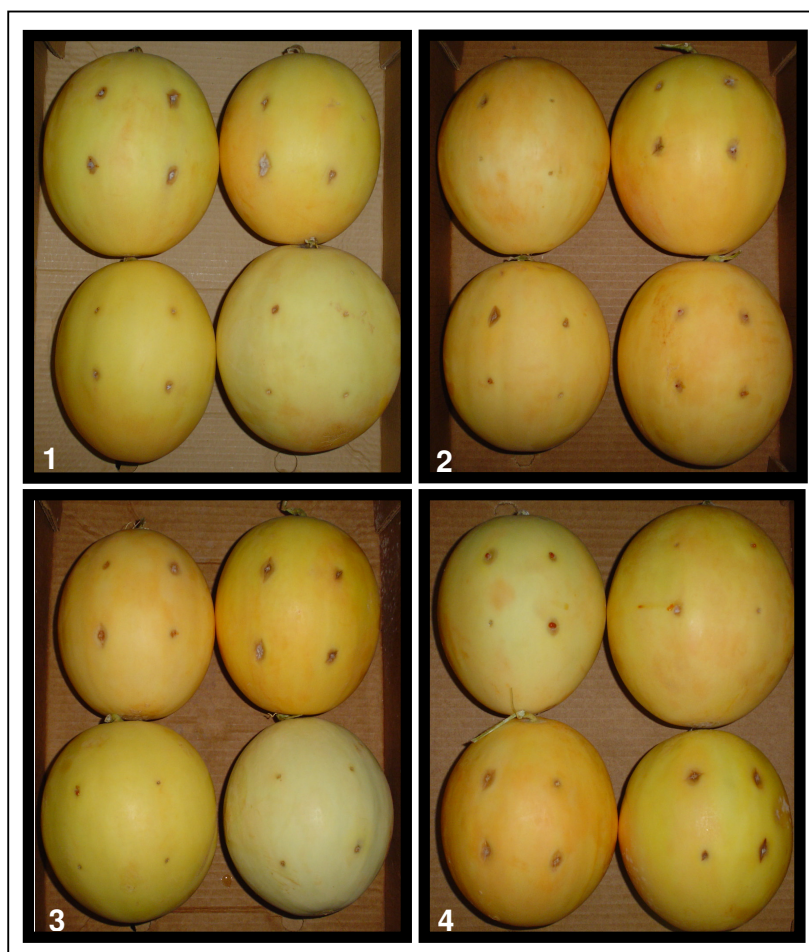


**Figura 9** – Efeito de diferentes concentrações de BTH na incidência (número de lesões apresentando doença) da podridão em frutos de meloeiro var. Orange flesh, causada por *Fusarium pallidoroseum* em diferentes dias após inoculação. Frutos controles foram tratados com água. Médias comparadas pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) não apresentaram diferença significativa.



**Figura 10** – Efeito de diferentes concentrações de BTH na severidade (tamanho da lesão) da podridão em frutos de meloeiro var. Orange flesh causada por *Fusarium pallidoroseum* em diferentes dias após inoculação. Frutos controles foram tratados com água. Médias comparadas pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) não apresentaram diferença significativa.

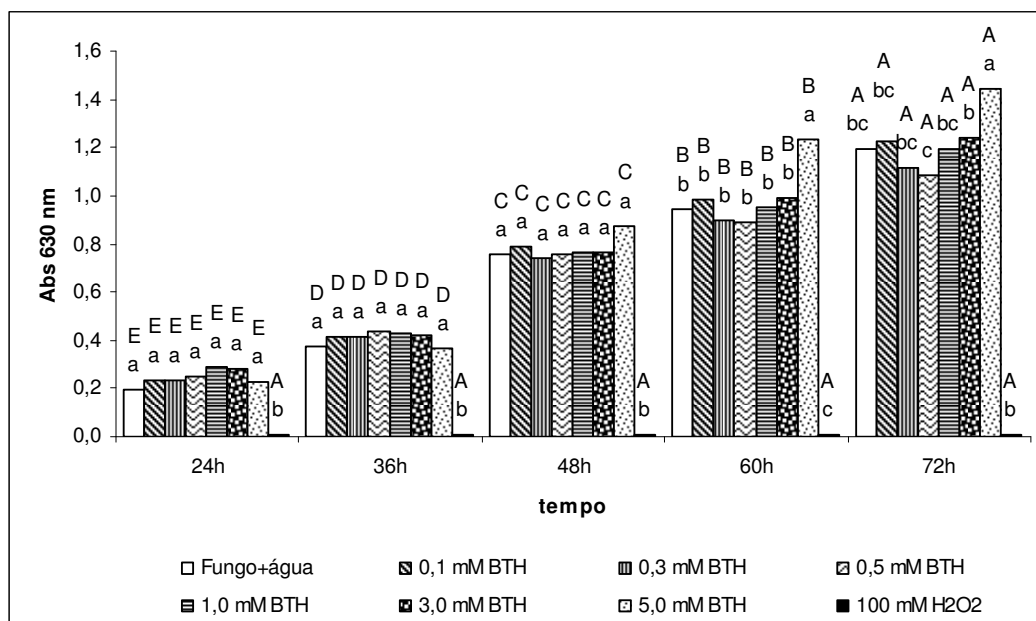




**Figura 11** – Aspecto visual dos frutos do meloeiro var. Orange flesh inoculados com *Fusarium pallidoroseum* no 4º dia após inoculação. Os números representam os diferentes tratamentos: 1- controle (água), 2- 0,5 mM de BTH, 3- 1,0 mM de BTH e 4- 2,0 mM de BTH.



**Figura 12** – Aspecto visual dos frutos do meloeiro var. Orange flesh inoculados com *Fusarium pallidoroseum* no 8º dia após inoculação. Os números representam os diferentes tratamentos: 1- controle (água), 2- 0,5 mM de BTH, 3- 1,0 mM de BTH e 4- 2,0 mM de BTH.



**Figura 13** – Efeito de diversas concentrações de BTH no crescimento micelial de *Fusarium pallidoroseum* em diferentes tempos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tempos ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.3).

## 5.2. Efeito do BTH na indução de enzimas de defesa no melão desafiado pelo *F. pallidoroseum*.

Com este experimento foi possível acompanhar o efeito do BTH sobre o comportamento de diversas enzimas relacionadas com a defesa do fruto, após inoculação com o fungo.

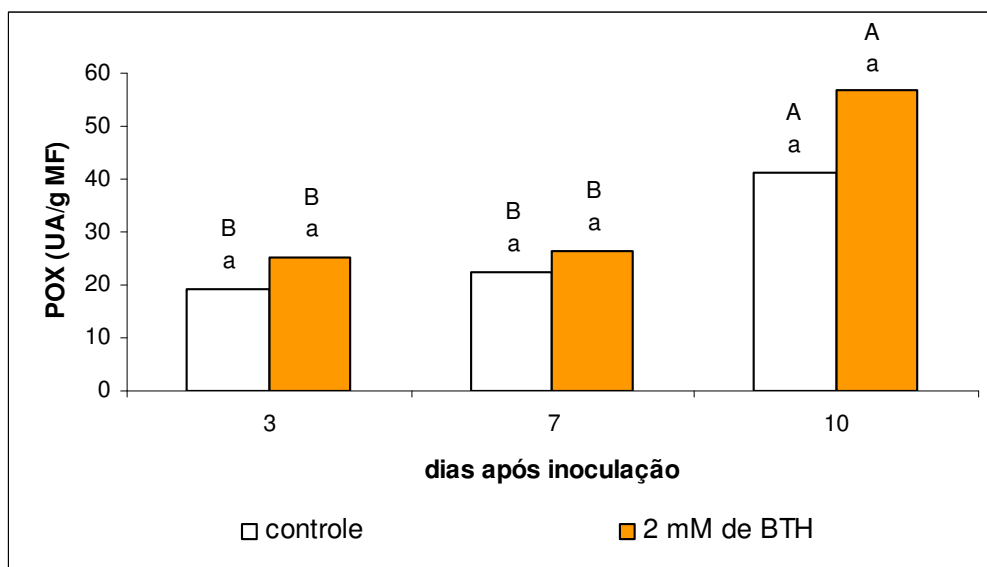
O tratamento com BTH não levou a uma maior expressão de POX em nenhum dos tempos analisados, quando comparado com o controle (Figura 14). Na última coleta, há um aumento significativo desta enzima.

A atividade da PAL não foi alterada pelo tratamento com BTH e não sofreu mudanças de expressão nas diferentes coletas (Figura 15).

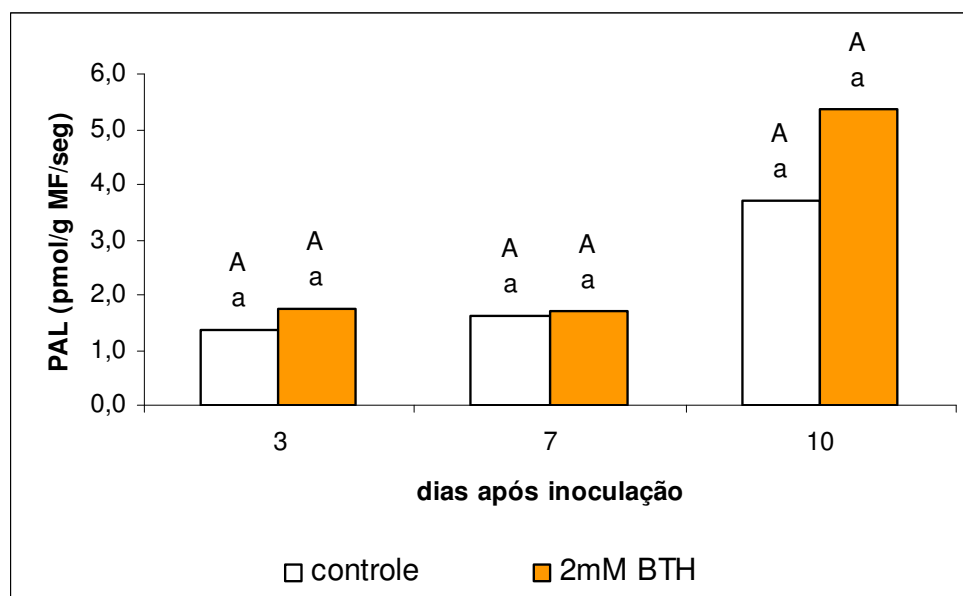
O tratamento com BTH não alterou os padrões enzimáticos da APX comparado com o tratamento controle, ao longo das coletas. A atividade da APX foi maior no 3º DAI, decaindo a níveis similares no 7º e 10º DAI (Figura 16).

Através do zimograma da SOD, mostrado na Figura 17, não foi observada diferença na expressão das diferentes isoformas (assinaladas pelas setas) nos tempos 3º, 7º e 10º DAI, comparando o controle com o tratamento com BTH.

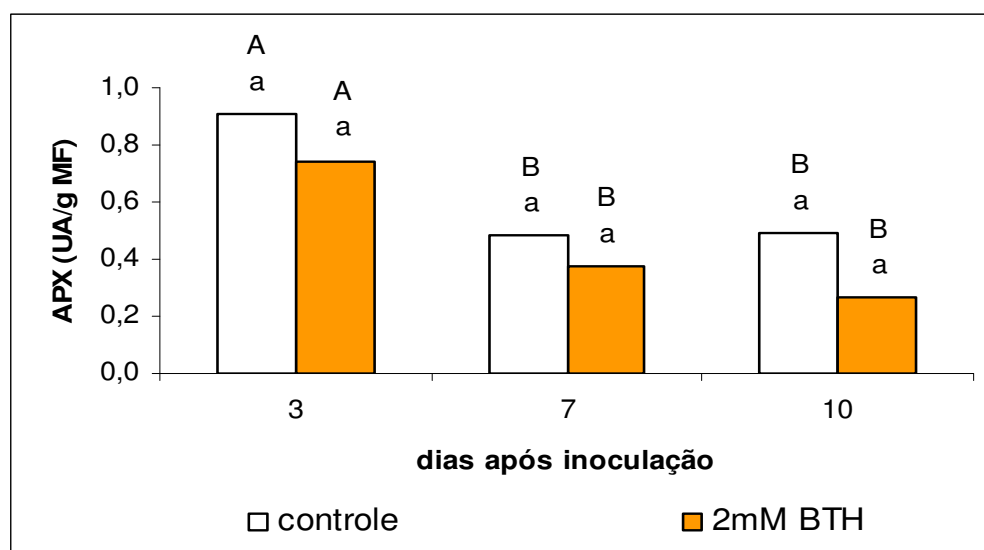
A atividade da GLU não foi alterada pela indução com BTH (Figura 18). Houve um aumento de atividade glucanásica no 7º e 10º DAI, comparada com a primeira coleta.



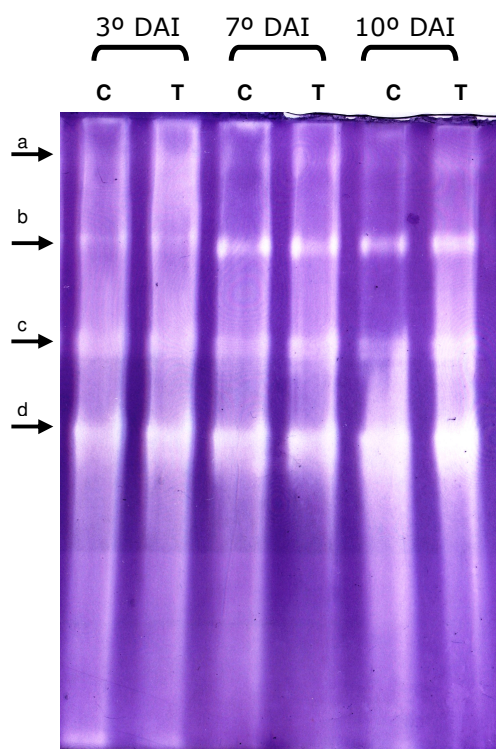
**Figura 14** – Atividade da peroxidase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com *Fusarium pallidoroseum*. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.4).



**Figura 15** – Atividade da fenilalanina amônia liase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com *Fusarium pallidoroseum*. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.6).

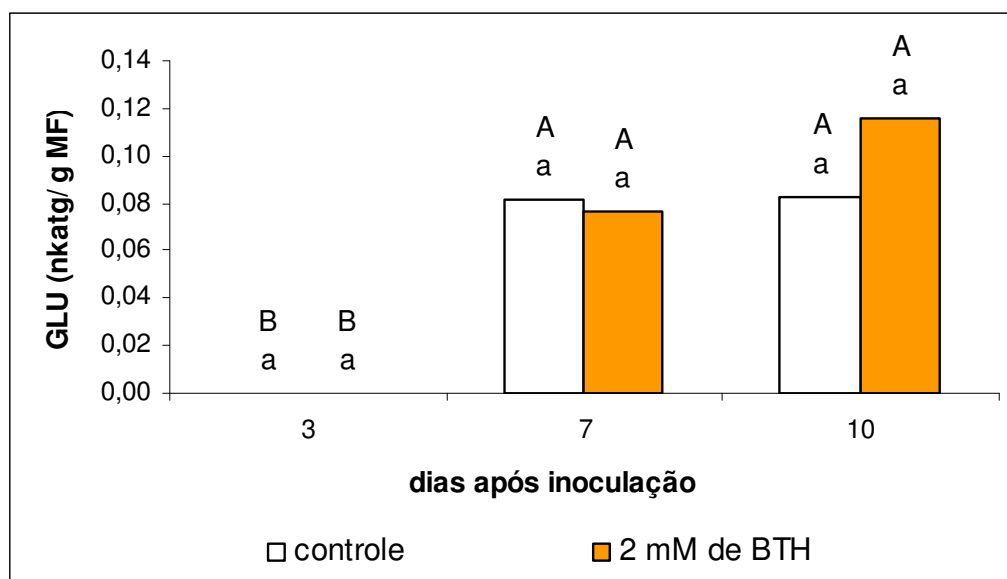


**Figura 16** – Atividade da ascorbato peroxidase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com *Fusarium pallidoroseum*. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.5).



**Figura 17** – Eletroforese revelada para atividade de superóxido dismutase de extratos totais de frutos do meloeiro var. Orange flesh em diferentes dias após inoculação (DAI) com *Fusarium pallidorozeum*. C: controle; T: tratamento com 2 mM de BTH. Setas indicam diferentes isoformas de SOD.





**Figura 18** – Atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase em frutos de meloeiro var. Orange Flesh em diferentes dias após inoculação com *Fusarium pallidoroseum*. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.7).

### 5.3. Efeito do BTH no peso fresco e na indução de enzimas de defesa em plantas do melão var. Orange flesh.

Neste experimento, foi possível acompanhar o efeito do tratamento com BTH nas concentrações 0,3 mM, 0,5 mM e 1,0 mM (i.a.) sobre o desenvolvimento das plantas e no comportamento de diversas enzimas relacionadas com a defesa do meloeiro ao longo do tempo.

As plantas desenvolveram-se homoganeamente até 4<sup>o</sup> DAT. Após este período, aquelas tratadas com as diversas concentrações do indutor apresentaram-se menores do que as do grupo controle (Figura 19a). As folhas secundárias tiveram seu tamanho bastante reduzido a partir do 6<sup>o</sup> DAT (Figuras 19b e 20).

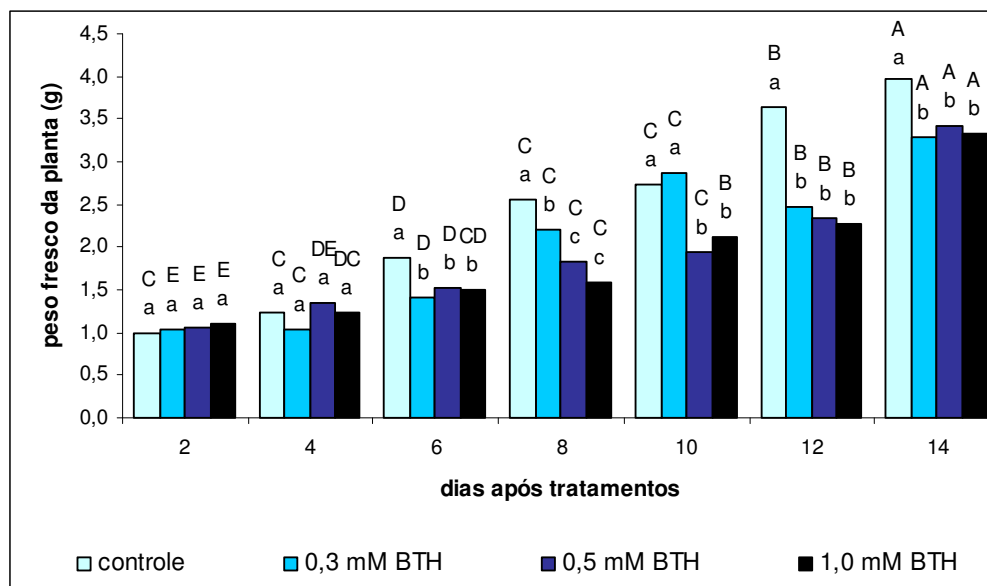
Os efeitos dos tratamentos, observados visualmente, refletiram no dado de peso fresco total da planta (Figura 21). A interação dos fatores tempo e tratamento para esta variável foi altamente significativa. No 2<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> DAT, as plantas tratadas nas diversas concentrações de BTH e as controle não diferiram quanto ao peso. Já no 6<sup>o</sup> DAT, as plantas induzidas com BTH apresentaram peso fresco menor, quando comparadas com o controle. Neste dia, plantas tratadas com diversas concentrações de BTH não diferiram estatisticamente entre si, mas foram, significativamente, diferentes do controle. No 8<sup>o</sup> DAT, as plantas tratadas com BTH nas concentrações 0,5 mM e 1,0 mM não diferiram entre si, mas apresentaram menores pesos, comparando-as com o outro tratamento; o tratamento 0,3 mM de BTH diferiu do controle. No 10<sup>o</sup> DAT, as plantas induzidas com 0,5 mM e 1,0 mM não diferiram entre si, mas apresentaram menores pesos de plantas, comparando-as com o outro tratamento; as plantas dos tratamento 0,3 mM de BTH e controle não diferiram entre si. No 12<sup>o</sup> DAT, todos os tratamentos com BTH diferiram estatisticamente das plantas controle, mas não foram diferentes entre si. No 14<sup>o</sup> DAT, a análise do peso das plantas foi semelhante ao 12<sup>o</sup> DAT, porém a diferença entre os tratamentos com BTH e as plantas controle foi menor.



**Figura 19** – Aspecto visual das plantas do melão var. Orange flesh (A) e das folhas secundárias (B) no 6º dia após aplicação dos tratamentos. Os números representam os diferentes tratamentos: C- controle; 0,3; 0,5; 1,0 mM de BTH.



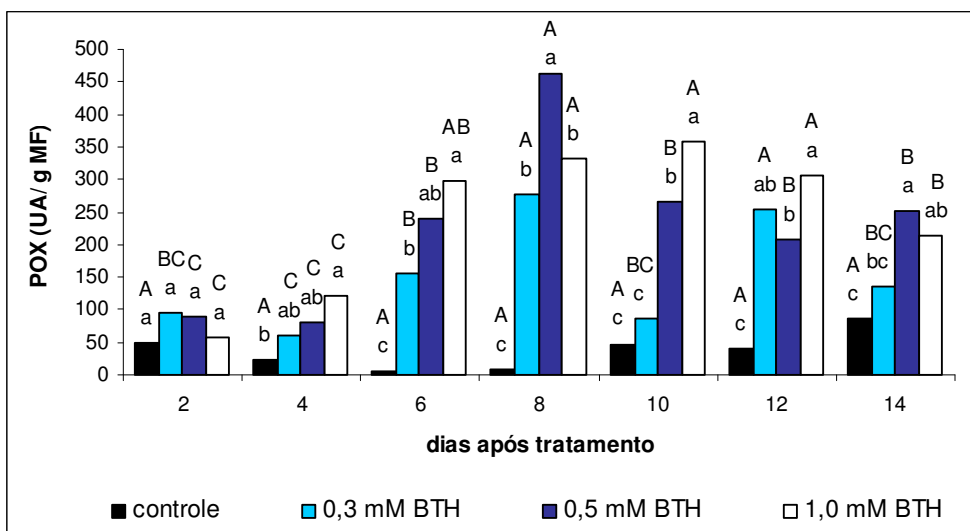
**Figura 20** – Aspecto visual das folhas primárias e secundárias do melão var. Orange flesh no 8º dia após aplicação dos tratamentos. Os números representam os diferentes tratamentos: C - controle; 0,3; 0,5; 1,0 mM de BTH.



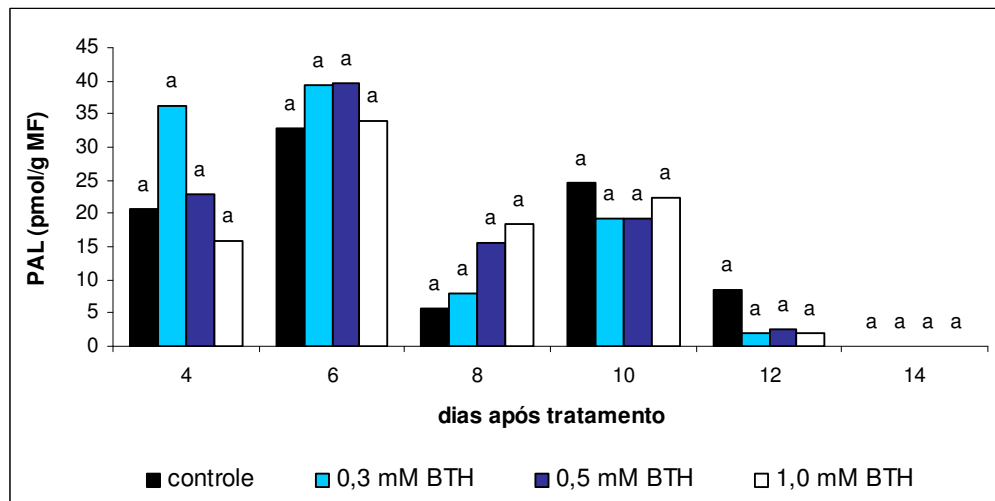
**Figura 21** – Peso médio das plantas de melão var. Orange flesh coletadas em diferentes tempos após tratamento. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.8).

Os fatores tempo e tratamento interagiram de forma significativa para a variável POX. De acordo com a figura 22, no 2º DAT, nenhum dos tratamentos diferiu entre si. Já no 4º DAT, a maior concentração de BTH, 1,0 mM, elevou significativamente a atividade peroxidásica em relação ao tratamento controle. No 6º DAT, todos os tratamentos com o indutor elevaram significativamente a atividade desta enzima, comparando-os com o grupo controle; os tratamentos 0,5 mM e 1,0 mM produziram os maiores valores de atividade enzimática, diferindo do tratamento 0,3 mM, mas não diferiram entre si. No 8º DAT, também, todos os tratamentos com BTH elevaram significativamente a atividade desta enzima, sendo estes aumentos de 3.045%, 5.545% e 3.670% nos tratamentos 0,3 mM, 0,5 mM e 1,0 mM de BTH, respectivamente. No 10º DAT, os tratamentos controle e 0,3 mM de BTH não se diferenciaram; as plantas tratadas com 0,5 mM de BTH apresentaram níveis de atividade maiores que os dois primeiros tratamentos e o tratamento 1,0 mM produziu os maiores níveis de atividade peroxidásica. No 12º DAT, os três tratamentos com BTH diferiram do controle, dentre os tratamentos com este indutor, a concentração 0,3 mM não diferiu de nenhuma das outras concentrações, mas os tratamentos 0,5 mM e 1,0 mM foram diferentes, tendo, este último, apresentado maiores valores enzimáticos. No 14º DAT, a atividade desta enzima nas plantas controle e tratadas com 0,3 mM não foi diferente, porém os outros dois tratamentos com o indutor mantiveram os níveis da enzima alto, mas não diferiram entre si.

O fator tratamento não atuou de forma significativa para a atividade da PAL. Contudo, o fator tempo influenciou significativamente para esta variável. No 4º DAT, foi verificada uma alta expressão desta enzima (Figura 23). No 6º DAT, foram observados os maiores valores de atividade enzimática. Porém, nas coletas seguintes, verificou-se uma contínua queda de expressão, chegando à zero na última coleta.



**Figura 22** – Atividade da peroxidase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamento. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.9).

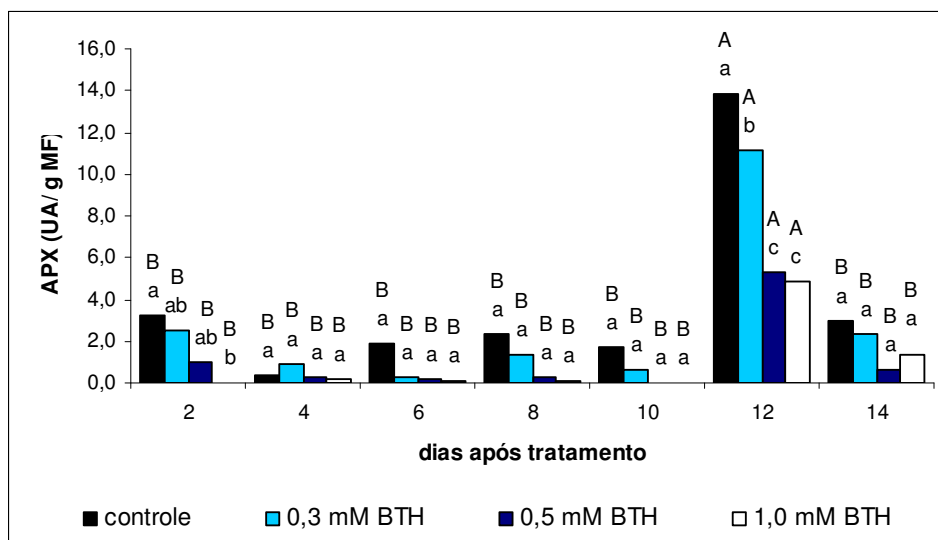


**Figura 23** – Atividade da fenilalanina amônia liase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamentos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Diferentes letras representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo) ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.11).

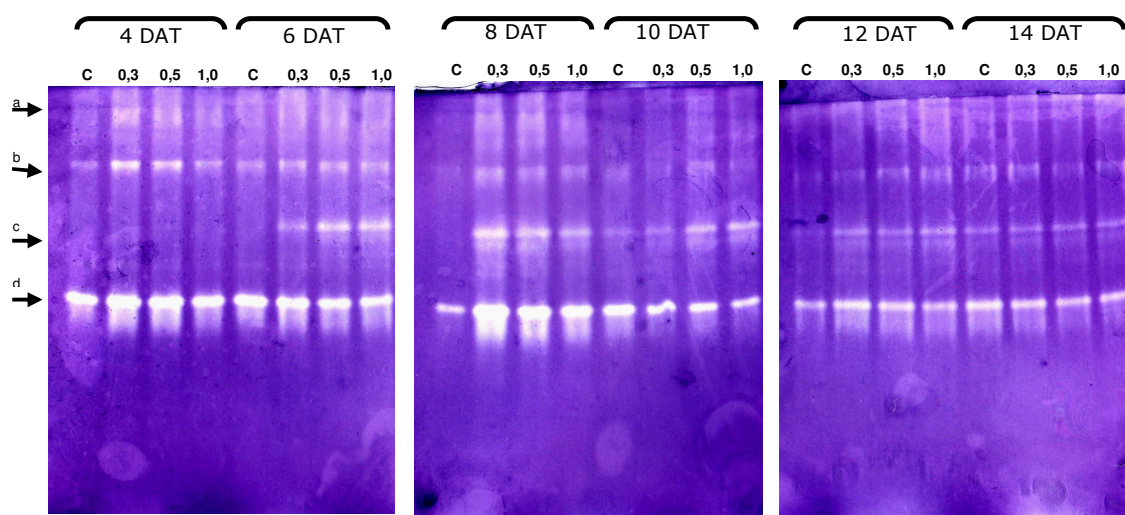


Os fatores tempo e tratamento interagiram de forma significativa para a variável APX. Foram observadas diferenças de atividade desta enzima, entre os grupos controle e induzidos com BTH, no 2º e 12º DAT (Figura 24). No 2º DAT, plântulas tratadas com 1,0 mM de BTH expressaram menos esta enzima. Já no 12º DAT houve um pico de atividade, onde as plântulas controles atingiram os maiores valores. Neste dia, plântulas tratadas com BTH nas concentrações 0,3 mM, 0,5 mM e 1,0 mM expressaram esta enzima, respectivamente, 20%, 62% e 65% menos em relação ao controle.

O zimograma da SOD permitiu observar a expressão de diferentes isoformas desta enzima ao longo do tempo nos tratamentos com BTH (Figura 25). No 4º DAT, já pôde ser observada uma maior expressão das bandas indicadas pelas setas 'a' e 'b' nos tratamentos 0,3 mM, 0,5 mM e 1,0 mM de BTH, quando comparadas com o controle. No 6º DAT, observa-se uma maior expressão da banda indicada pela seta 'c' nos tratamentos 0,5 mM e 1,0 mM de BTH. No 8º DAT, observa-se uma maior expressão de todas as bandas indicadas pelas setas nos diversos tratamentos com BTH, quando comparadas com o controle. No 10º DAT, essa diferença entre plantas tratadas com BTH e o grupo controle já não é mais tão evidente. No 12º DAT, há uma sutil diferença na expressão das quatro isoformas, assinaladas pelas setas, quando comparados os diversos tratamentos com BTH e o tratamento controle. No 14º DAT, quase não há diferença na expressão de isoformas de SOD entre os grupos tratados e o controle.

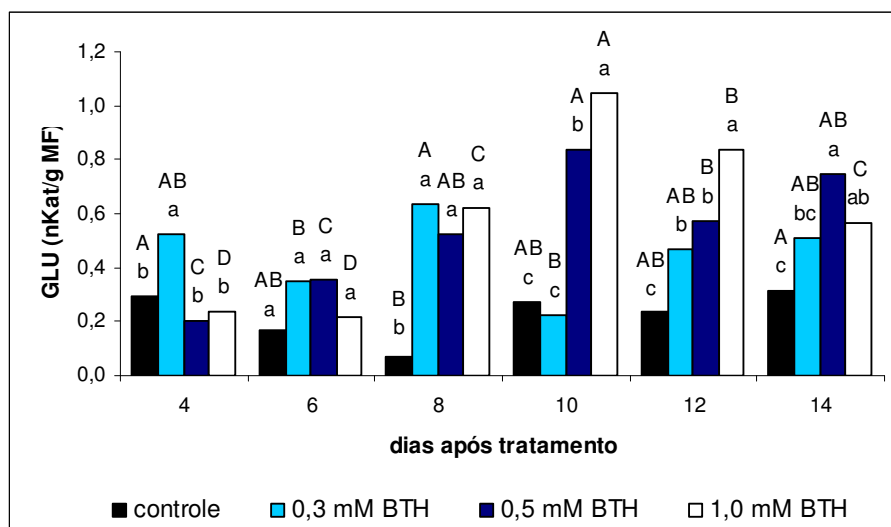


**Figura 24** – Atividade da ascorbato peroxidase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamentos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.10).



**Figura 25** – Eletroforese revelada para atividade de superóxido dismutase de extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh em diferentes dias após tratamento (DAT) com BTH. C: controle; Tratamentos = 0,3, 0,5 e 1,0 mM de BTH. Setas indicam diferentes isoformas de SOD.

Os fatores tempo e tratamento correlacionaram-se de forma significativa com atividade da GLU. No 4º DAT foi observado uma maior atividade desta enzima nas plantas tratadas com 0,3 mM de BTH, diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos, que não diferiram entre si (Figura 26). No 6º DAT, nenhum dos tratamentos se diferenciou significativamente entre si para esta variável. Um aumento na atividade de GLU nas plantas induzidas com as diversas concentrações de BTH foi observado no 8º DAT, quando comparado com o grupo controle, mas não diferiram entre si. Neste 8º DAT, os níveis de atividade de GLU nos tratamentos 0,3 mM, 0,5 mM e 1,0 mM de BTH foram 838%, 1102% e 812%, respectivamente, maiores em relação às plântulas controle. No 10º DAT, os tratamentos controle e 0,3 mM de BTH não se diferenciaram. Neste dia, o tratamento 0,5 mM de BTH expressou níveis enzimáticos significativamente mais elevados que o controle, porém os maiores valores desta enzima foram obtidos com o tratamento 1,0 mM de BTH, que diferenciou-se significativamente de todos os outros. Na última coleta, 14º DAT, os níveis de atividade desta enzima nos tratamentos controle e 0,3 mM de BTH não diferiram entre si, mas houve induções com 0,5 mM e 1,0 mM de BTH, contudo não diferiram entre si.



**Figura 26** – Atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase em extratos totais de folhas secundárias de plantas de melão var. Orange flesh, coletadas em diferentes tempos após tratamentos. Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos dentro de cada categoria (tempo). Letras maiúsculas representam a comparação de cada tratamento ao longo do tempo. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os dias ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.12).

## 6. Discussão

Durante o curso de sua co-evolução, plantas e patógenos vêm desenvolvendo uma relação intrínseca, resultado de uma contínua troca de informações moleculares. Patógenos têm desenvolvido uma série de estratégias para parasitar plantas e, por sua vez, plantas têm desenvolvido diversos mecanismos de defesa (ZHAO *et al.*, 2005).

Além disso, já é conhecida a ocorrência de variações nas atividades de certas enzimas vegetais quando as plantas estão sob estresses, contudo não há um padrão universal de resposta, podendo haver tanto uma correlação positiva como negativa, indicando que, em geral, as enzimas atuam mais como indicadoras da evolução da resposta de resistência do que como elementos destinados a exercer, diretamente, a defesa ou regular o metabolismo que leva o vegetal a se ajustar àquela situação adversa (MARTINS-MIRANDA, 2002).

Poucos trabalhos são realizados com resistência em pós-colheita e, em menor quantidade, relacionados com a cultura do melão. Entretanto, uma grave podridão pós-colheita causada pelo *F. pallidoroseum* é observada nos frutos e a busca por estratégias de controle da doença é necessária.

Vários artigos têm sido publicados sobre resistência induzida à patógenos. Entretanto, muitas questões ainda não foram respondidas e requerem mais investigações (HEIL e BOSTOCK, 2002).

Apesar de o BTH ser considerado um protetor de culturas e ativador de resistência contra um amplo espectro de patógenos em diversas espécies vegetais, a aplicação de BTH em frutos do meloeiro var. Orange flesh, depois de colhidos, não resultou em efetiva redução da incidência e severidade da podridão causada pelo *F. pallidoroseum*, nas condições experimentais do presente trabalho (Figuras 7 e 8). O uso deste indutor químico na concentração de 2 mM também não alterou o padrão de enzimas relacionadas com a defesa no fruto contra a podridão pós-colheita causada pelo *F. pallidoroseum* (Figuras 12, 13, 14, 15, 16). O dado de não proteção dos frutos contra a podridão foi compatível com a resposta bioquímica de não indução. Portanto, o aparecimento da doença foi um reflexo do não aumento de expressão de enzimas de defesa.

Um questionamento que poderá sempre ocorrer é se o BTH foi capaz de atravessar a barreira física de proteção do fruto e, assim, penetrá-lo. O BTH é um sinalizador exógeno, análogo do ácido salicílico (AS), que é uma molécula de ocorrência natural em vegetais e capaz de penetrar em frutos (QIN *et al.*, 2003; CHAN e TIAN, 2005; YAO e TIAN, 2005). Essa analogia é observada tanto pela função, já que o BTH pode ativar resposta de defesa nas plantas por imitar o sinal endógeno do AS, como pela estrutura, já que esses dois compostos possuem um anel aromático e um grupo carboxila substituído em uma posição (WENDEHENNE *et al.*, 1998). Além disso, este indutor é conhecido por ser um produto de fácil e rápida absorção e translocação em vegetais (AGRAWAL *et al.*, 1999) e vários trabalhos já demonstraram sua capacidade de penetrar em frutos (SRIVASTAVA e DWIVEDI, 2000; LIU *et al.*, 2005) Dessa forma, espera-se que este indutor penetre nos tecidos do fruto do meloeiro.

Embora já seja conhecida a capacidade do BTH em alterar os padrões de expressão de diversas enzimas relacionadas com a defesa em plantas, é importante que se continuem os estudos para novas espécies vegetais, pois essas mudanças não são uma regra para todos os sistemas. Resultados de um sistema planta-patógeno não são, necessariamente, representativos pra outras espécies (LEON *et al.*, 2001). Além disso, elicitores de SAR podem ser inviáveis para alguns sistemas planta-patógeno (TERRY e JOYCE, 2004).

Relatos de falha na indução por elicitores são observados em outros trabalhos. De acordo com Bokshi *et al.* (2003), aplicação pré-colheita tardia de BTH não foi efetiva em induzir resistência de tubérculos de batata, depois de colhidos, contra podridão causada pelo *Fusarium semitectum*. Também, segundo Yao e Tian (2005), tratamento pós-colheita de cereja com AS e metil-jasmonato não reduziu significativamente a incidência da doença causada por *Monilinia fructicola*. Em melões tipo Rock (japonês) cultivar Eldorado e melões tipo Hami cultivar Early Yellow Hami, BTH protegeu os frutos contra o aparecimento de *Alternaria ssp.*, apenas quando combinada a aplicação deste químico na planta, antes do florescimento, com um fungicida no fruto depois de colhido (HUANG *et al.*, 2000).

Durante as últimas décadas, muitas tentativas têm sido feitas para desenvolver métodos não-fungicidas para controlar podridões pós-colheita de várias espécies vegetais. Elas incluem modificações do ambiente como o armazenamento dos frutos à temperatura que suprimem o desenvolvimento do patógeno,

modificação da umidade e atmosfera, tratamento térmico e a indução de resistência por aplicação de irradiação UV ou elicitores. Dentre estas, a indução de defesas por aplicação de elicitores tem-se tornado uma promissora opção de efetivo manejo de doenças vegetais. Entretanto, nenhum destes métodos, quando usado sozinho, confere níveis satisfatórios no controle de podridões (JANISICWICZ e KORSTEN, 2002; TERRY e JOYCE, 2004).

Muitas pesquisas com ativadores químicos têm-se concentrado em doenças pré-colheita (JOYCE e JOHSON, 1999). A dificuldade de se trabalhar com frutos em pós-colheita é refletida pela escassez de trabalhos que há nessa área. Portanto, mais pesquisas são requeridas para o completo entendimento do papel que a indução de resistência possa ter para se obter supressão de doenças em pós-colheita (TERRY e JOYCE, 2004).

BTH não exerceu nenhuma ação fungicida *in vitro* sobre o crescimento do *F. pallidoroseum*. Este indutor já é citado por não possuir atividade fungicida (TERRY e JOYCE, 2004). De acordo com Friedrich *et al.* (1996), o BTH já teve seu efeito testado contra várias espécies de microorganismos patogênicos e não apresentou efeito direto sobre qualquer um deles.

Como o tratamento com BTH em melão pós-colheita não foi eficaz em proteger os frutos contra a podridão causada pelo *F. pallidoroseum*, foi realizado um experimento na planta com objetivo de averiguar se esse indutor seria capaz de aumentar a expressão de enzimas relacionadas com a defesa da planta do melão var. Orange flesh.

Plantas tratadas com diversas concentrações de BTH tiveram seu crescimento reduzido a partir do 6º DAT (Figuras 18 e 19). Essa redução do crescimento pode estar correlacionada com a lignificação da parede celular, o que restringe tanto o aumento do volume celular como a mitose nos tecidos meristemáticos vegetais. Efeito negativo do BTH no crescimento da planta do melão já havia sido observado (BUZI *et al.*, 2004). Isto tem sido interpretado como resultado de uma competição metabólica entre os processos envolvidos no crescimento da planta e a síntese *de novo* de compostos relacionados à defesa (HEIL *et al.*, 2000).

BTH, nas diversas concentrações, foi capaz de aumentar a expressão de POX a partir do 6º DAT (Figuras 20). Vários trabalhos relatam a capacidade do BTH em elevar os padrões desta enzima (IRITI e FAORO, 2003; SOYLU *et al.*, 2003; LIU



*et al.*, 2005; MATOLEPSZA, 2006). A família das peroxidases encontra-se amplamente distribuída nas espécies vegetais. Seu papel na defesa vegetal está associado com progressiva incorporação de compostos fenólicos na parede celular. A POX participa das etapas finais na via de biossíntese de lignina. Seu papel nesta via metabólica é oxidar os álcoois de fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapsil. Esses álcoois formam um polímero pela ação de enzimas que geram radicais livres intermediários (BOERJAN *et al.*, 2003). Assim, o aumento da atividade desta enzima pode levar a um reforço na parede celular e aumento da resistência contra patógenos (SOYLU *et al.*, 2003).

Em todos os tratamentos, controle e induzidos com BTH, houve um aumento na expressão de PAL no 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> DAT (Figura 21). A PAL é uma enzima que está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primários e secundários das plantas, de forma que a reação que ela catalisa é uma importante etapa de formação de muitos compostos fenólicos, que estão relacionados com a defesa vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2004). Na literatura é relatado que um primeiro pico de PAL é induzido poucas horas após indução (inoculação) de plantas e tem relação com o início da reação de hipersensibilidade. Um segundo pico de atividade, mais tardio, também é observado e correlaciona-se com a formação de compostos fenólicos e lignificação de células (SILVA *et al.*, 2002). Um aumento da atividade desta enzima observado no 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> DAT coincidiu com um menor crescimento das plantas e uma maior indução de POX nas plantas tratadas com BTH, comparadas com as controle. Portanto, nas plantas induzidas com BTH, pode-se realmente relacionar um menor crescimento das plantas e, conseqüentemente, redução no peso fresco total, com o fenômeno de lignificação celular. Outros trabalhos mostraram que um aumento da resistência de plantas pelo tratamento com BTH tem sido também explicado pelo aumento de atividade da PAL e síntese de compostos fenólicos, que estão relacionados com a biossíntese de lignina (STADNIK e BUCHENAUER, 1999; 2000). O fortalecimento da parede celular é um importante aspecto quando as plantas são submetidas a estresses como indução de resistência (SMITH e DUBERY, 1997; BAYSAL *et al.*, 2005). O aumento da atividade da PAL nas plantas controles não foi acompanhado de um menor crescimento das plantas, nem maior expressão de POX e, dessa forma, esse aumento enzimático pode estar relacionado com a síntese de metabólitos que são derivados para outras rotas bioquímicas e não com os mecanismos de defesa da planta.

Vários processos biológicos produzem ROS. Porém, situações de estresse levam as plantas à produzirem um substancial aumento destas espécies. Para evitar os possíveis danos celulares causados por ROS, plantas dispõem de enzimas antioxidativas para prevenir o descontrole dos eventos oxidativos (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Dentre estas enzimas destacam-se a SOD e APX.

A capacidade do BTH inibir a APX, assim como a catalase, já foi citada em outros trabalhos (WENDEHENNE *et al.*, 1998). No presente trabalho foi observada a inibição da APX no 2º DAT, na concentração 1 mM de BTH; e no 12º DAT, em todas as concentrações de BTH. Esse resultado sugere que o papel do BTH pode também estar relacionado com o aumento de níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em tecidos tratados. É citado na literatura que o  $H_2O_2$  pode funcionar como um mensageiro secundário em SAR ou agir diretamente contra o patógeno (HUNT *et al.*, 1996). A participação da APX no mecanismo de defesa de plantas é atribuída à capacidade desta enzima em catalisar a quebra do  $H_2O_2$ , com consumo de ascorbato, formando monodehidroascorbato e água. Portanto, esta enzima desempenha um importante papel no metabolismo do peróxido de hidrogênio em plantas (ASADA, 1992; FERNANDES, 2004).

Os tratamentos com BTH aumentaram a expressão de várias isoformas de SOD, reveladas em géis de eletroforese (Figura 23). Estas enzimas eliminam radicais superóxidos, protegendo as plantas de estresses oxidativos. Em resumo, a indução do BTH em plantas de melão var. Orange flesh leva à uma maior expressão de SOD que converte superóxido em  $H_2O_2$ , porém inibe a atividade da APX, que converte  $H_2O_2$  para água. Isso sugere que POX possui também um importante papel de detoxificar o peróxido em plantas de melão, sob essa condição de indução. Resultados semelhantes de expressão enzimática foram encontrados em *Phaseolus vulgaris* sob condições de estresse salino (JEBARA *et al.*, 2005).

Um aumento na atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi observado nas plantas tratadas com BTH, a partir do 8º DAT (Figura 24). A participação desta enzima no mecanismo de defesa vegetal está associada à capacidade dela em degradar parede celular de fungos patogênicos. Além disso, os produtos da atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase podem funcionar como elicitores de resposta de defesa (RIVERA *et al.*, 2002). Geralmente, o conteúdo dessas enzimas é baixo em plantas sadias. Porém, quando ocorre infecção por patógenos ou indução por elicitores, a atividade aumenta rapidamente. Um aumento de atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase implica que

houve indução de SAR, já que indução de PR-proteínas é um marcador de defesa ativa (BARGABUS *et al.*, 2004). Outros trabalhos têm demonstrado a capacidade do BTH em induzir expressão de glucanases (BOKSHI *et al.*, 2003; BUZI *et al.*, 2004).

Finalmente, este experimento de indução de resposta de defesa da planta sugere que o BTH tem potencial para ser utilizado como um protetor da cultura do meloeiro, já que foi capaz de alterar os padrões de várias enzimas de defesa que poderão aumentar a resistência contra futuros desafios. Em decorrência desta observação, surge uma importante pergunta: *poder-se-ia usar esta estratégia para o controle da podridão pós-colheita e se aumentar, indiretamente, a defesa dos frutos através da indução da planta em si por este mecanismo de elicitação?* A resposta para esta questão requer que se conduzam experimentos para comprovação desta hipótese, mas uma forte possibilidade é que o BTH possa afetar as células geradoras dos frutos durante o florescimento, levando à mudanças metabólicas de longa duração que serão conduzidas aos frutos. O tempo e a distância em que essas mudanças serão afetadas requerem grandes explicações sobre mecanismos básicos dos efeitos do BTH sobre as plantas (HUANG *et al.*, 2000).

## 7. Conclusões

O presente estudo demonstrou que tratamento com BTH, nas condições experimentais, não foi eficaz para proteger os frutos do meloeiro var. Orange flesh contra a podridão pós-colheita causada pelo *Fusarium pallidoroseum*. Este indutor também não foi capaz de alterar os padrões de várias enzimas relacionadas com a defesa do fruto. Entretanto, quando aplicado na planta, se mostrou capaz de induzir diversas enzimas com função de defesa. Portanto, o BTH tem potencial para ser utilizado como uma tecnologia na proteção do meloeiro, podendo levar a um possível controle da podridão causada pelo *F. pallidoroseum* em frutos elevando as defesas via indução da planta.

## 8. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, A. A., TUZUN, S., BENT, E. **Induced Plant defenses Against Pathogens and Herbivores, Biochemistry, Ecology and Agriculture**, 1<sup>a</sup> ed, St Paul, Minnesota. APS Press, 1999.

ANDRIGUETTO, J. R., KOSOSKI, A. K. Alavanca para exportação. **Revista Cultivar – Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 4, p. 19-21, 2003.

ANFOKA, G. H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid *S*-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, v. 19, p. 401-405, 2000.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzymes in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.

BARGABUS, R. L., ZIDACK, N. K., SHERWOOD, J. E., JACOBSEN, B. J. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. **Biological Control**, v. 30, p. 342–350, 2004.

BARRETO, R. W., EVANS, H. C. The mycoflora of *Chromolaena odorata* in the neotropics and the potential for biological control. In: **Third International workshop on biological control and management of *C. Odorata*, 1988, Tailândia**. Anais eletrônicos... Disponível em: <<http://www.cpitt.uq.edu.au/chromolaena/siamhome.html>>. Acesso em: 12 nov. 2002.

BAYSAL, O., TURGUT, C., MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia Plantarum**, v. 49(4), p. 599-604, 2005.

BAYSAL, O., ZELLER, W. Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to acibenzolar-S-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65(6), p. 305-315, 2004.

BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44(1), p. 276-287, 1971.

BENHAMOU, N., NICOLE, M. Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. **Plant Physiology and Biochemical**, v. 37(10), p. 703-719, 1999.

BLEICHER, E., MELO, Q. M. S. Manejo da mosca-branca *Bemisia argentifolii*, 1994. In: Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical, Circular Técnica 3**, 1998, 15p.

BOERJAN, W., RALPH, J., BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519–546, 2003.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. In: **Molecular Plant Pathology: A practical approach**. Edited by S. J. GURR, M. J. McPHERSON, and D. J. BOWLES, Vol II, 1992.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. In: **Molecular Plant Pathology**. Edited by S.J. GURR, M. J. McPHERSON, and D. J. BOWLES, IRL Press, New York, p. 23-29, 1993.

BOKSHI, A. I., MORRIS, S. ., DEVERALL, B. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\beta$ -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, v. 52, p. 22–27, 2003.

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

BROCKAERT, W. F., TERRAS, F. R. G., CAMMUE, B. P. A., VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, p. 55-60, 1990.

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

CHAN, Z., TIAN, S. Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39(3), p. 314-320, 2005.

CHAVES, C., LIMA, D. F. C., FACÓ, E., AZEVEDO, F. R., OLIVEIRA, F. Z., CRUZ, J. A. L., FREIRE, J. M., MAGALHÃES, J. S. B., FURLAN, R. A., LIMA, R. C. A., PINTO, S. A. A., MENEZES JR., V. **FrutiSéries**, 2. Ceará – Melão, 2003. 12 p.

COLARES, J. S. **Uso de defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pedúnculo do melão**. 2000. 23f Monografia, Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

CORREA, R. S. B., MORAES, J. C., AUAD, A. M., CARVALHO, G. A. Silicon and acibenzolar-S-methyl as resistance inducers in cucumber, against the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotype B. **Neotropical Entomology**, v. 34(3), p. 429-433, 2005.

DAVIS, B. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Annual Review of the New York Academy of Science**, v. 121, p. 404, 1964.

DATTA, S. K., MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**. Florida: Ed. CRC Press, 1999. 291p.

DEMPSEY., D. A., SHAH, J., KLESSIG., D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Critical Review in Plant Science**, v. 18, p. 547–75, 1999.

DOERGE, S., BAILLIEUL, F., PIERREL, M. A., SAINDRENAN, P., FRITIG, B., KAUFFMANN, S. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitivity to a fungal glycoprotein elicitor. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, p. 646-655, 1997.

DROBY, S. PORAT, R. COHEN, L., WEISS, B., SHAPIRO, B., PHILOSOPHADAS, S., MEIR, S. Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p. 1-5, 1999.

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

EL-SHORA , H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from Marrow cotyledons. **Plant Science**, v. 162, p. 1-7, 2002.

ESQUERRE´-TUGAYE´ MT, BOUDART G, DUMAS B. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plant pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 157–63, 2000.

FAJARDO, J. E., MCCOLLUM, T. G., MCDONALD, R. E., MAYER, R. T. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. **Biological Control**, v. 13(3), p. 143-151, 1998.

FERNANDES, A. B. Produção de frutas irrigadas – oportunidades potenciais de negócios no Nordeste de Brasil. **Seminário Internacional Políticas de Irrigação e Drenagem**, Brasília, 2 a 3 de dezembro de 1997. Brasília, 1998. 231p.

FERNANDES, C. F. **Expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e ao mecanismo de defesa do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum***. 2004. 162f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

FERNANDES, O. A., FERREIRA, C. C., MONTAGNA, M. A. **Manejo integrado de pragas do meloeiro: manual de reconhecimento das pragas e táticas de controle**. Jaboticabal: Funep-CNPq, 2000. 28p.

FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust: its genetic and other implications. **Phytopathology**, v. 45, p. 680-685, 1955.

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

FRITIG, B., HEITZ, T., LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 16-22, 1998.



GACHOMO, E. W., SHONUKAN, O. O., KOTCHONI, S. O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2(2), p. 26-32, 2003.

GADELHA, J. C. **Controle preventivo e curativo da podridão pós-colheita de frutos de melão com produto alternativo**. 2002. 37f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

GONZALEZ-AGUILAR, G. A., WANG, C. Y., BUTA, J. G., HRIZEK, D. T. Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe 'Tommy Atkins' Mangoes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 767–773, 2001.

HAHLBROCK, K., SCHEEL, D., LOGEMANN, E., NURNBERGER, T., PARNISKE, M., REINOLD, S. Oligopeptide elicitor-mediated defence gene activation in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 92, p. 4150–4157, 1995.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55(2), p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. Antioxidants and regulation of defense. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, p. 211-212, 2005.

HEIL, M., HILPERT, A., KAISER, W., LINSERMAIR, K. E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? **Journal Ecological**, v. 88, p. 645–654, 2000.

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

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station of California, Berkeley**, v. 347, p. 139, 1950.

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

HUNT, M. D., NEUENSCHWANDER, U. H., DELANEY, T. P., WEYMANN, K. B., FRIEDRICH, L. B., LAWTON, K. A., STEINER, H. Y., RYALS, J. A. Recent advances in systemic acquired resistance research – a review. **Gene**, v. 179, p. 89-95, 1996.

HUTCHESON, S. W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 59-90, 1998.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>> Acesso em: 5 ago. 2006.

INZÉ, D., MONTAGU, M. V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 104, p. 153-158, 1995.

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

JANISIEWICZ, M. J., KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 411-441, 2002.

JEANDET, P., DOILLET-BREUIL, A. C., BESSIS, R., DEBORD, S., SBAGHI, M., ADIAN, M. Phytoalexins from vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2731-2741, 2002.

JEBARA, S., JEBARA, M., LIMAM, F., AOUANI, M. E. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 929-936, 2005.

JOYCE, D. C., JONHSON, G. I., Prospects for explanation of natural disease resistance in harvest horticultural crops. **Postharvest News and Information**, v. 10, p. 45-48, 1999.

KEEN N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v. 24, p. 447-463, 1990.

KNIGHT, S. C., ANTHONY, U. M., BRADY, A. M., GREELAND, A. J., HEAMY, S. P., MURRAY, D. C.; POWEL, K. A., SCHULZ, M. A., SPINKS, C. A., WORTHINGTON, P. A., YOULE, D. Rationale and perspectives in the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 349-372, 1997.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34(5), p. 713-721, 1993.

KUÉ, J. Development and future direction of induced systemic acquired resistance in plants. **Crop Protection**, v. 19, p. 859-861, 2000.

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

LÉON, J. ROJO, E. SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. Wound signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1-9, 2001.

LIU H., JIANG, W., BI, Y., LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 263-269, 2005.

LURIE, S. Postharvest heat treatments of horticultural crops. **Horticultural Reviews**, v. 22, p. 91-121, 1998.

MALOLEPSZA, U. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. **Crop Protection**, v. 25(9), p. 956-962, 2006.

MARQUENIE, D., LAMMERTYN, J., GEERAERD, A. H., SOONTJENS, C., VAN IMPE, J. F., NICOLAI, B. M., MICHIELS, C. W. Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 187-196, 2002.

MARTINS-MIRANDA, A. S. **Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] exposta à salinidade e deficiência hídrica.** 2002. 85f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 2002.

MARTINEZ, C. A., LOUREIRO, M. E., OLIVA, M. A., MAESTRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science**, 160, 505-515, 2001

MATAMOROS, M. A., DALTON, D. A., RAMOS, J., CLEMENTE, M. R., RUBIO, M. C., BECANA, M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. **Plant Physiology**, v. 133, p. 499–509, 2003.

MENEZES, J. B., FILGUEIRAS, H. A. C., ALVES, R. E., MAIA, C. E., ANDRADE, G. G., ALMEIDA, J. E. S., VIANA, F. M. P. Características do melão para exportação. In: ALVES, R.E. (Ed) Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, **Melão Pós-colheita**, 2000, p.13-22.

MORAN, J. F., JAMES, E. K., RUBIO, M. C., SARATH, G., KLUCAS, R. V., BECANA, M. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from Cowpea root nodules. **Plant Physiology**, v. 133, p. 773–82, 2003.

MORI, T., SAKURAI, M., SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and Ds-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, v. 160, p. 355-360, 2001.

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

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação. **Tabela brasileira de alimentos** – Versão II. Campinas: NEPA – UNICAMP, 105p, 2006. Disponível em <[http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_versao2.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf)> Acesso em: 15 ago. 2006.

NIMCHUK, Z., ROHMER, L., CHANG, J. H., DANGL J. L. Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 288-294, 2001.

NOCTOR G, FOYER C. H. Ascorbate and glutathione keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–79, 1998.

ORNSTEIN, L. Disk electrophoresis. I. Background and theory. **Annual Review of the New York Academy of Science**, v. 121, p. 321, 1964.

OWEN, K. J., GREEN, C. D., DEVERALL, B. J. A benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology**, v. 31, p. 47–53, 2002.

PEIXOTO, P. H. P., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., MOSQUIM, P. R., MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11(3), p. 137-143, 1999.

PENG, M., KUÉ , J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. **Phytopathology**, v. 82, p. 696–699, 1992.

QIN, G. Z., TIAN, S. P., XU, Y., WAN, Y. K. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62(3), p. 147-154 , 2003.

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

REIMANN, S., DEISING, H. B. Fungicides: risk of resistance development and search for new targets. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 33, p. 329-349, 2000.

RIVERA, M. E., CONIDA, J. C., OLEA, F., VICENTE, A. De, PÉREZ-GARCIA, A. Differential expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in susceptible and resistant melon cultivars in response to infection by *Shaerotheca fusca*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 257-265, 2002.

RIZZO, A. A. N., FERREIRA, M. R., BRAZ, L. T. Ação de acibenzolar-s-methyl (BTH) isolado e em combinação com fungicidas no controle do cancro da haste em melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, v. 21(2), p. 238-240, 2003.

RUESS, W., MÜLLER, K., KNAUF-BEITER, G., KUNZ, W., STAUB, T. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. **Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases**. In Ciba's Contribution, p. 9, 1996.

SANHUEZA, R. M. V. Produção integrada de frutos no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, v. 25(suplemento), p. 284-292, 2000.

SANTOS, R., HÉROUART, D., PUPPO, A., TOUATI, D. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in Rhizobium-legume symbiosis. **Molecular Microbiology**, v. 38, p. 750–759, 2000.

SCHIRRA, M., D'HALLEWIN, G., BEN-YEHOSHUA, S., FALLIK, E. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, p. 71–85, 2000.

SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y., YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V. de, Resistência induzida em plantas contra patógenos. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças e Pragas em Hortaliça**. Lavras: UFLA, 2001. p. 221-234.

SILVA, M. C., NICOLE, M., GUERRA-GUIMARÃES, L., RODRIGUES JR, C. R. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, p. 169-183, 2002.

SILVEIRA, J. A. G., COSTA, R. C. L., OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187-194, 2001.

SYNGENTA. **Descrição do produto**, 2006.

SMINORFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, v. 125, p. 27-58, 1993.

SMITH, F., DUBERY, I. A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. **Phytochemistry**, v. 44(5), p. 811-815, 1996.

SMITH-BECKER, J., KEENA, N. T., BECKER, J. O. Acibenzolar-S-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and cucumber mosaic virus in cantaloupe. **Crop Protection**, v. 22, p. 769-774, 2003.

SOYLU, S., BAYSAL, O., SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, v. 165(5), p. 1069-1075, 2003.

SPARLA, F., ROTINO, L., VALGIMIGLI, M. C., PUPILLO, P., TROST, P. Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (*Erwinia amylovora*). **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 269-279, 2004.

SRIVASTAVA, M. K., DWIVEDI, U. N. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. **Plant Science**, v. 158, p. 87-96, 2000.

STADNIK, M. J., BUCHENAUER, H. Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazole-induced and quantitative resistance in wheat. **Journal of Phytopathology**, v. 147, p. 615-622, 1999.

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

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

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

TAIZ, L., ZEIGER, E. (Eds) **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 690 p.

TAVARES, S. C. de H. (Editora técnica) Melão. Fitossanidade: aspectos técnicos. **Frutas Brasil**. Embrapa – Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 87 p, 2002.

TERAO, D. **Estratégias de controle de podridões em pós-colheita de frutos de meloeiro**. 2003. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Recife, Pernambuco, 2003.

TERRY, L. A., JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 33, p. 1-13, 2004.

TRIPATHI, P., DUBEY, N. K. Explanation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 235-245, 2004.

UNNIKRISHNAN, V., NATH, B. S. Hazardous chemicals in foods. **Indian Journal Dairy Bioscience**, v. 11, p. 155-158, 2002.

URBANEK H., KUZNIAK-GEBAROWSKA E., HERKA K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, p. 43-50, 1991.

VANACKER, H., CARVER, T.L.W., FOYER, C.H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1289–1300, 2000.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753-765, 1997.



VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VENTURA, J. A. Manejo de doenças e produção integrada de frutas tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, v. 28(suplemento), p. 57-61, 2003.

VIANA, F. M. P., SANTOS, A. A. dos, FREIRE, F. das C. O., CARDOSO, J. E., VIDAL, J. C. **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na região Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Circular Técnica 12, 22p, 2001.

WARD, E. R., UKNES, S. J., WILLIAMS, S. C., DINCHER, S. S., WEIDERHOLD, D. L. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

WEN P-F., CHEN, J-Y., KONG, W. F., PAN, Q-H., WAN, S-B., HUANG, W-D. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science**, v. 169, p. 928-934, 2005.

WENDEHENNE, D., DURNER, J., CHEN, Z., KLESSIG, D. F. Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry**, v. 47, p. 651-657, 1998.

YAO, H., TIAN, S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 253-262, 2005.

YEDIDIA, I., BENHAMOU, N., KAPULNIK, Y., CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38(11), p. 863-873, 2000.

ZAINURI, D. C., JOYCE, D. C., WEARING, A. H., COATES, L., TERRY, L. Effects of phosphonate and salicylic acid treatments on anthracnose disease development and ripening of 'Kensington Pride' mango fruit. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, p. 805-813, 2001.

ZAMBOLIM, L. Patologia pós-colheita de frutas e hortaliças. In: Simpósio de controle de doenças de plantas 2, Lavras: **Anais...** Lavras: UFLA, 2002, p. 139-182.

ZHAO, H., WANG, B-C., ZHAO, H-C., WANG, J. B. Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, p. 36–40, 2005.

## 9. Anexos

### 6.1. Análise de variância da variável **Incidência** do **Experimento I**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	6	4.1595982	0.6932664	0.8696	0.52190	ns
TRATAMENTO	3	1.9553571	0.6517857	0.8175	0.50950	ns
TEMPO*TRATAMENTO	18	1.0680804	0.0593378	0.0744	0.99999	ns
RESIDUO	84	66.9687500	0.7972470			
TOTAL	111	74.1517857				

MEDIA GERAL = 2.080357

COEFICIENTE DE VARIACAO = 42.920%

### 6.2. Análise de variância da variável **Severidade** do **Experimento I**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	6	21328.3266352	3554.7211059	10.0569	0.00001	**
TRATAMENTO	3	1560.0394634	520.0131545	1.4712	0.22703	ns
TEMPO*TRATAMENTO	18	228.3203187	12.6844621	0.0359	1.00000	ns
RESIDUO	84	29690.7608472	353.4614387			
TOTAL	111	52807.4472645				

MEDIA GERAL = 28.064196

COEFICIENTE DE VARIACAO = 66.991%

### 6.3. Análise de variância da variável **Crescimento Fúngico** do **Experimento I**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMP	4	11.7476678	2.9369169	440.7022	0.00001	**
TRATAMENTO	7	7.1459486	1.0208498	153.1847	0.00001	**
TEMPO*TRATAMENTO	28	1.9896758	0.0710598	10.6630	0.00001	**
RESIDUO	80	0.5331340	0.0066642			
TOTAL	119	21.4164262				

MEDIA GERAL = 0.634983

COEFICIENTE DE VARIACAO = 12.856 %

### 6.4. Análise de variância da variável **Peroxidase** do **Experimento II**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	2	2646.6479682	1323.3239841	7.0991	0.00932	**
TRATAMENTO	1	329.3974398	329.3974398	1.7671	0.20653	ns
TEMPO*TRATAMENTO	2	117.8179233	58.9089617	0.3160	0.73839	ns
RESIDUO	12	2236.8798078	186.4066507			
TOTAL	17	5330.7431391				

MEDIA GERAL = 31.889055

COEFICIENTE DE VARIACAO = 42.814%

### 6.5. Análise de variância da variável **Ascorbato Peroxidase** do **Experimento II**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	2	0.7210334	0.3605167	52.0811	0.00002	**
TRATAMENTO	1	0.1216888	0.1216888	17.5795	0.00153	**
TEMPO*TRATAMENTO	2	0.0102111	0.0051056	0.7376	0.50234	ns
RESIDUO	12	0.0830666	0.0069222			
TOTAL	17	0.9360000				

MEDIA GERAL = 0.543333

COEFICIENTE DE VARIACAO = 15.313%

### 6.6. Análise de variância da variável **Fenilalanina amônia liase** do **Experimento II**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	2	3.1837673	1.5918836	1.0274	0.38914	ns
TRATAMENTO	1	3.5227418	3.5227418	2.2737	0.15479	ns
TEMPO*TRATAMENTO	2	8.5238978	4.2619489	2.7508	0.10283	ns
RESIDUO	12	18.5925195	1.5493766			
TOTAL	17	33.8229264				

MEDIA GERAL = 1.451611

COEFICIENTE DE VARIACAO = 85.749 %

### 6.7. Análise de variância da variável **$\beta$ -1,3-glucanase** do **Experimento II**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	2	0.0331621	0.0165811	10.5314	0.00261	**
TRATAMENTO	1	0.0003920	0.0003920	0.2490	0.63129	ns
TEMPO*TRATAMENTO	2	0.0012790	0.0006395	0.4062	0.67944	ns
RESIDUO	12	0.0188933	0.0015744			

TOTAL 17 0.0537264

MEDIA GERAL = 0.059556

COEFICIENTE DE VARIACAO = 66.626 %

### 6.8. Análise de variância da variável **Peso da Planta** do **Experimento III**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	6	55.0903680	9.1817280	294.3691	0.00001	**
TRATAMENTO	3	4.0263935	1.3421312	43.0292	0.00001	**
TEMPO*TRATAMENTO	18	4.7415553	0.2634197	8.4453	0.00001	**
RESIDUO	56	1.7467074	0.0311912			
TOTAL	83	65.6050242				

MEDIA GERAL = 2.069000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 8.536%

### 6.9. Análise de variância da variável **Peroxidase** do **Experimento III**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	6	387379.5469083	64563.2578181	24.0326	0.00001	**
TRATAMENTO	3	563948.8198908	187982.9399636	69.9736	0.00001	**
TEMPO*TRATAMENTO	18	333692.8225941	18538.4901441	6.9007	0.00001	**
RESIDUO	56	150443.0652828	2686.4833086			
TOTAL	83	1435464.2546761				

MEDIA GERAL = 165.970840

COEFICIENTE DE VARIACAO = 31.229%

### 6.10. Análise de variância da variável **Ascorbato Peroxidase** do **Experimento III**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	6	642.3621619	107.0603603	41.5320	0.00001	**
TRATAMENTO	3	116.7203140	38.9067713	15.0931	0.00001	**
TEMPO*TRATAMENTO	18	111.2805529	6.1822529	2.3983	0.00673	**
RESIDUO	56	144.3558000	2.5777821			
TOTAL	83	1014.7188289				

MEDIA GERAL = 2.131429

COEFICIENTE DE VARIACAO = 75.327%

6.11. Análise de variância da variável **Fenilalanina amônia liase** do **Experimento III**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	5	2185.0254927	437.0050985	25.5517	0.00001	**
TRATAMENTO	3	56.2149457	18.7383152	1.0956	0.36057	ns
TEMPO*TRATAMENTO	15	471.0102556	31.4006837	1.8360	0.05645	ns
RESIDUO	48	820.9322172	17.1027545			
TOTAL	71	3533.1829112				

MEDIA GERAL = 7.262084

COEFICIENTE DE VARIACAO = 56.947%

6.12. Análise de variância da variável  **$\beta$ -1,3-glucanase** do **Experimento III**, realizadas no programa SANEST.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F	
TEMPO	5	1.0096546	0.2019309	13.6014	0.00001	**
TRATAMENTO	3	1.6288155	0.5429385	36.5705	0.00001	**
TEMPO*TRATAMENTO	15	1.6654560	0.1110304	7.4786	0.00001	**
RESIDUO	48	0.7126250	0.0148464			
TOTAL	71	5.0165510				

MEDIA GERAL = 0.469014

COEFICIENTE DE VARIACAO = 25.979%