

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
PATRÍCIA GRAOSQUE ULGUIM ZÜGE

**INFLUÊNCIA DO ETILENO E ÁCIDO JASMÔNICO NA DEFESA DO FRUTO DO
TOMATEIRO CONTRA O FUNGO CAUSADOR DO MOFO CINZENTO**

Curitibanos

2016

PATRÍCIA GRAOSQUE ULGUIM ZÜGE

**INFLUÊNCIA DO ETILENO E ÁCIDO JASMÔNICO NA DEFESA DO FRUTO DO
TOMATEIRO CONTRA O FUNGO CAUSADOR DO MOFO CINZENTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Sestari.

Curitibanos

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Züge, Patrícia Graosque Ulguim
Influência do etileno e ácido jasmônico na defesa do
fruto do tomateiro contra o fungo causador do mofo
cinzento / Patrícia Graosque Ulguim Züge ; orientador, Ivan
Sestari - Curitibanos, SC, 2016.
30 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Micro-Tom. 3. Hormônios vegetais. 4.
Fungo necrotrófico. I. Sestari, Ivan. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III.
Título.



SERVIÇO FEDERAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CURITIBANOS**

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Rodovia Ulisses Gaboardi, km3 – Zona Rural – CEP: 89520-000 – Curitibanos/SC

CEP 89520-000 – Curitibanos – SC

TELEFONE: (48) 3721 -4168 Email: agronomia.cbs@contato.ufsc.br

Patrícia Graosque Ulguim Züge

**INFLUÊNCIA DO ETILENO E ÁCIDO JASMÔNICO NA DEFESA DO FRUTO DO
TOMATEIRO CONTRA O FUNGO CAUSADOR DO MOFO CINZENTO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheira Agrônoma, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 18 de novembro de 2016.

Prof. Dr. Samuel Luiz Fioreze
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ivan Sestari
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Msc. Claudia Aparecida Guginski Piva

Membro da banca examinadora

Universidade do Oeste de Santa Catarina

Profa. Dra. Viviane Glaser

Membro da banca examinadora

Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos mutantes utilizados no experimento.....	11
Tabela 2. Diferentes sintomas observados nos frutos durante as análises.....	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Suscetibilidade da cultivar MT e do mutante de tomateiro em etileno *Nr* ao fungo *Botrytis cinerea* após três dias de inoculação. (A) Incidência da doença, (*) diferença significativa dada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($01 \leq p < .05$); (B) Severidade da doença, medida pelo índice de severidade que vai de 0-4 (número de lesões com sintoma): 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3=três lesões e 4= quatro lesões. (*) Diferença significativa dada pelo Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} > 0,05$) ao nível de 5% de probabilidade. (C) Evolução do Diâmetro das lesões. Barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$).....18

Figura 2. Porcentagem dos diferentes sintomas da doença ocorridos nas lesões após inoculação do fungo *Botrytis cinerea*, conforme a Tabela 2. (A) Terceiro dia após inoculação; (B) Quarto dia após inoculação; (C) Quinto dia após inoculação.....20

Figura 3. Esquema de sinalização do etileno e ácido jasmônico em *Arabidopsis* em resposta ao ataque de patógenos necrotróficos (LORENZO et al., 2003).....21

Figura 4. Suscetibilidade da cultivar MT e dos mutantes de tomateiro em etileno *Nr* e em ácido jasmônico *jai1-1*, ao fungo *Botrytis cinerea*. (A) Incidência da doença; (B) Severidade da doença, medida pelo índice de severidade que vai de 0-4 (número de lesões com sintoma): 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3=três lesões e 4= quatro lesões. (**) Diferença significativa dada pelo Kruskal-Wallis ao nível de 1% de probabilidade ($p\text{-valor} < 0.01$) e ao nível de 5% de probabilidade ($p\text{-valor} > 0,05$). (C) Evolução do Diâmetro das lesões. (**) Diferença significativa dada pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade ($p < .01$) e de 5% de probabilidade ($01 \leq p < .05$). Barras verticais indicam o erro padrão ($n=6$).....23

Figura 5. Porcentagem dos diferentes sintomas da doença ocorridos nas lesões após inoculação do fungo *Botrytis cinerea*, conforme a Tabela 2. (A) Primeiro dia após inoculação; (B) Segundo dia após inoculação; (C) terceiro dia após inoculação.....24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	12
2.2 TRIAGEM DO MUTANTE <i>jai1-1</i>	13
2.3 TRATAMENTOS.....	13
2.4 INOCULAÇÃO DO FUNGO NOS FRUTOS.....	14
2.5 VARIÁVEIS ANALISADAS.....	15
2.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4 CONCLUSÕES	26
Abstract.....	26
REFERÊNCIAS	27

Influência do etileno e ácido jasmônico na defesa do fruto do tomateiro contra o fungo causador do mofo cinzento

Patrícia Graosque Ulguim Züge

Resumo

O fungo *Botrytis cinerea* é um dos principais causadores de perdas na pós-colheita de diversas frutas e hortaliças, pois pode causar danos em todas as partes da planta. Para estudar o papel do etileno e do ácido jasmônico na suscetibilidade do fruto do tomateiro ao fungo *Botrytis cinerea* foram utilizadas a cultivar Micro-Tom e os mutantes *Nr* que é insensível ao etileno e o *jai1-1* que é insensível ao ácido jasmônico. Foram realizados dois experimentos, o primeiro utilizando-se a cultivar MT e o mutante *Nr*, com temperatura de armazenamento dos frutos inoculados de 21° C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). No segundo experimento foi utilizada a cultivar MT e os mutantes *Nr* e *jai1-1* com temperatura de armazenamento dos frutos após inoculação de 25° C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). Os frutos de cada genótipo foram lesionados na região equatorial e inoculados com o fungo *Botrytis cinerea* (10^5 esporos/mL⁻¹), foi avaliada a suscetibilidade representada pela incidência, severidade e diâmetro de lesão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos para o primeiro experimento, sendo eles MT controle (sem 1-MCP), *Nr* sem 1-MCP, MT e *Nr* com 1-MCP, cada tratamento continha quatro repetições com dez frutos cada. Para o segundo experimento foram seis tratamentos sendo eles MT (controle), *jai1-1* e *Nr* sem 1-MCP, *jai1-1* com 1-MCP, *Nr* com 1-MCP e MT com 1-MCP, sendo cada tratamento com cinco repetições de três frutos. Os resultados demonstram o bloqueio do etileno nos frutos da cultivar MT reduz a incidência e severidade da doença. Essa redução também ocorreu nos frutos do mutante de tomateiro *Nr* independente da aplicação ou não do 1-MCP, isso indica que o etileno favorece a incidência e severidade. Outro fato observado foi que os frutos do mutante insensível ao ácido jasmônico apresentaram alta suscetibilidade a doença e esta suscetibilidade foi ainda maior nos frutos de *jai1-1* quando tratados com 1-MCP. Com estes resultados, foi possível demonstrar que há interação entre o ácido jasmônico e etileno, e que estes dois hormônios estão envolvidos nas respostas de defesa contra fungos necrotróficos, porém são necessários mais estudos para elucidar como ocorre esta interação, utilizando-se duplos mutantes entre o etileno e o ácido jasmônico com a cultivar Micro Tom de tomateiro como “background” genético.

Palavras-chave: Micro-Tom. Hormônios vegetais. Fungo necrotrófico.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de frutas e hortaliças, sendo classificado como o terceiro maior produtor mundial de frutas e o sétimo maior produtor de hortaliças (SEBRAE, 2015; SEAB, 2015). Dentre as hortaliças de maior importância econômica no mercado nacional, pode-se destacar o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), que é nativo da região andina indo do Equador até o norte do Chile (ALVARENGA, 2004). No Brasil os três principais estados produtores de tomate são Goiás, que produz principalmente para processamento industrial, Minas Gerais e São Paulo que são os principais produtores de tomates para consumo *in natura* (IBGE, 2016).

Mesmo com várias pesquisas e investimentos no setor, o Brasil ainda apresenta altos índices de perdas pós-colheita, que são causadas por fatores abióticos, como transporte e armazenamento inadequados e por fatores bióticos, causados principalmente por fungos fitopatogênicos. As perdas ocasionadas por fungos podem ocorrer no campo, mas se intensificam no período de pós-colheita em vegetais e frutas (YU et al., 2009).

As maiores perdas na pós-colheita do tomate são ocasionadas por patógenos, sendo os principais o *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Rhizopus stolonifer* (Ehreb., Fr.) Vuill e *Fusarium spp.* (ZHAO et al., 2008). Os fitopatógenos podem ser classificados quanto à forma de nutrição, como biotróficos que retiram nutrientes de tecidos vivos, necrotróficos que consomem nutrientes das células mortas e hemibiotróficos que possuem as duas formas de nutrição (biotrófica e necrotrofica) (GLAZEMBROOK, 2005). O *Botrytis cinerea* é um fungo necrotrófico, podendo sobreviver no solo associado com matéria orgânica, em restos culturais ou ainda na forma de escleródios (TÖFOLI et al., 2011; JARVIS, 1989). A doença causada pelo *B. cinerea* é conhecida como mofo cinzento ou botrytis, e é responsável por perdas consideráveis em frutas e hortaliças, uma vez que pode causar danos em todas as partes da planta (LOPES; REIS, 2011). Durante a pós-colheita e armazenamento, os frutos com a doença apodrecem rapidamente, ocorrendo na lesão o desenvolvimento de uma camada de micélio branco algodinoso que posteriormente torna-se de cor cinza pela presença de conídios (KLUGE et al., 2002).

Os hormônios vegetais são de grande importância para o desenvolvimento das plantas, estudos recentes sugerem que algumas classes de hormônios vegetais estão envolvidas na defesa de órgãos vegetais contra o ataque de patógenos (MONTEIRO, 2010). Dentre estas classes, os jasmonatos além de serem reguladores de crescimento, auxiliam na defesa das

plantas contra estes ataques, induzindo a expressão de genes relacionados à defesa da planta contra estresses (THALER; OWEN; HIGGINS, 2004; SOARES; MACHADO, 2007; ROHWER; ERWIN, 2008; YU et al., 2009).

O metil jasmonato (MeJa) é o principal derivado do ácido jasmônico e é conhecido por ter um papel fundamental nas respostas de defesa que regulam e induzem a resistência a fungos patogênicos (YU et al., 2009). Há uma infinidade de respostas da planta quanto a síntese e presença do MeJa, onde a aplicação do mesmo como gás pode ativar defesas e prevenir contra distúrbios de pós-colheita (ROHWER E ERWIN, 2008).

Assim como os jasmonatos o etileno também está envolvido em algumas respostas de mecanismo defesa das plantas, desempenhando importante função contra estresses bióticos como patógenos e estresses abióticos (ferimentos, hipóxia e *chilling*). Além disso, o etileno é responsável por regular vários aspectos do ciclo de vida da planta incluindo a germinação da semente, iniciação da raiz, desenvolvimento das raízes secundárias, desenvolvimento da flor, determinação do sexo, amadurecimento do fruto e senescência de frutos (LIN; ZHONGE; GRIERSON, 2009).

A indução da expressão de alguns genes relacionados à defesa requer tanto o etileno como o ácido jasmônico, enquanto outros genes de defesa são especificamente ativados pela ação isolada de cada uma dessas classes de hormônios (GLAZEBROOK, 2005). Patógenos necrotróficos se beneficiam da morte celular do hospedeiro, por este motivo a resistência não esta ligada a resposta de hipersensibilidade e sim a mecanismos de defesa desencadeados por um conjunto de respostas ativadas pela sinalização por jasmonato e/ou etileno (GLAZEBROOK, 2005).

Lorenzo et al., (2003) citam que o fator de transcrição ETR1 (ethylene reponse factor1) em *Arabidopsis thaliana* age abaixo da inserção entre as rotas do etileno e do jasmonato, podendo este fator de transcrição ser um elemento chave na interação entre ambos os sinais para regulação de genes de defesa. A sinalização dependente do jasmonato prossegue através da síntese do jasmonato aumentada em resposta ao ataque do patógeno e consequentemente aumenta na expressão de genes efetores de defesa como PDF 1.2 (LORENZO et al., 2003). Alguns genes regulados por jasmonato também são regulados por etileno. No caso do PDF 1.2, a expressão induzida requer os dois hormônios (etileno e jasmonato) (FARMER; ALMERAS; KRISHNAMURTHY, 2003, GUO; ECKER, 2004; GLAZEBROOK, 2005).

Uma das melhores formas de estudar o papel dos hormônios vegetais, na atualidade, se faz através da utilização de mutantes hormonais. Plantas mutantes com alterações endógenas na

percepção ou resposta aos diversos fitormônios tem demonstrado ser eficaz no estudo de tais compostos, pois as alterações estão diretamente associadas com o hormônio envolvido na mutação. Mutantes hormonais como o *Jasmonic acid insensitive-1 (jai1-1)* que é insensível ao ácido jasmônico e o *Never ripe (Nr)* que possui baixa sensibilidade ao etileno estão introgrididos na cultivar com fenótipo miniatura, denominada Micro-Tom (MT). Esta cultivar foi proposta como um modelo para estudos genéticos por Meissner et al., (1997), pois apresenta algumas vantagens como porte reduzido, rápido ciclo de vida, podendo em até três meses, produzirem frutos maduros e sementes viáveis (CAMPOS, 2009; CARVALHO et al., 2011).

A disponibilidade em laboratório de vários genótipos mutantes, em tomateiro, impactados na via do etileno e do ácido jasmônico constitui uma importante ferramenta a ser explorada visando compreender melhor o papel isolado dessas classes hormonais na suscetibilidade dos frutos ao *Botrytis*. Com isso, o objetivou-se neste trabalho, estudar o papel do etileno e do ácido jasmônico na suscetibilidade do fruto do tomateiro ao fungo *Botrytis cinerea*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ecologia e Morfofisiologia Vegetal da UFSC, Campus Curitibanos. O cultivo dos genótipos de tomateiro para obtenção de frutos foi realizado na casa de vegetação com temperatura controlada (média de 28°C) e a irrigação das plantas foi realizada manualmente, de acordo com a necessidade das plantas. Os genótipos utilizados no trabalho foram a cultivar Micro-Tom (MT) e os mutantes *Never ripe (Nr)* e *jasmonic acid-1 (jai1-1)* (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos mutantes utilizados no experimento.

Mutante	Hormônio	Descrição / Função gênica	Referência
<i>Never ripe (Nr)</i>	etileno	Baixa sensibilidade ao etileno. Defectivo para gene homólogo a <i>ETR1</i> de <i>Arabidopsis</i> , um receptor de etileno. Amadurecimento retardado.	Wilkinson et al., (1995)
<i>Jasmonic acid insensitive-1 (jai1-1)</i>	ácido jasmônico	Baixa sensibilidade ao ácido jasmônico. Defectivo para um gene homólogo a <i>COII</i> de <i>Arabidopsis</i> .	Li et al., (2004); Campos et al., (2009)

Para o cultivo do mutante *Nr* e da cultivar MT, foi realizada a semeadura em vasos de 250 mL contendo substrato comercial (Plantmax HT, Eucatex) com vermiculita expandida na proporção de 1:1. Para cada litro de substrato foi adicionado 4 g de calcário e 1 g de adubo NPK na formulação 10-10-10. Aproximadamente duas semanas após a semeadura, quando as plântulas apresentarem o primeiro par de folhas verdadeiras, foi realizado o transplante para vasos do tipo jardineira com capacidade para 8 litros, contendo a mesma proporção de substrato comercial e vermiculita expandida. Foram cultivadas quatro plantas por vaso, totalizando dez vasos para cada genótipo.

2.2 TRIAGEM DO MUTANTE *jai1-1*

Para cultivo do mutante *jai1-1* foi necessário realizar primeiramente uma triagem das plântulas germinadas, como proposto por Li et al., (2004). As plântulas de tomateiro colocadas para germinar em meio contendo o Metil Jasmonato (MeJa), apresentam acúmulo de antocianina no hipocótilo e inibição do crescimento radicular, porém as plântulas insensíveis ao ácido jasmônico são capazes de crescer e se desenvolver normalmente, não apresentando este acúmulo de antocianina (LI et al., 2004).

Foi realizado primeiramente uma desinfecção das sementes com hipoclorito e colocadas para germinar em uma caixa gerbox contendo papel filtro umedecido e uma pequena quantidade MeJa, estes gerbox foram forrados com papel alumínio e colocados em um ambiente com ausência de luz em temperatura ambiente. Após três dias foi realizada uma triagem, e todas as plântulas que germinaram e apresentaram um acúmulo de antocianina no hipocótilo foram descartadas e posteriormente o gerbox foi colocado em um ambiente com fotoperíodo por dois dias e novamente foi realizada uma triagem, permanecendo somente as plântulas insensíveis ao ácido jasmônico (*jai1-1* homozigotos). Depois de realizadas as triagens as plântulas foram transplantadas para uma caixa plástica (cumbuca) contendo substrato (substrato comercial e vermiculita expandida, na proporção 1:1) e permaneceram em ambiente controlado por mais uma semana. As plantas que apresentaram o primeiro par de folhas verdadeiras foram transferidas para vasos tipo jardineira com capacidade para 8 litros contendo o mesmo substrato e adubo utilizado para os demais genótipos.

Detalhamentos adicionais a respeito da descrição dos genótipos, protocolos de cultivo e do controle fitossanitário que foram utilizados podem ser obtidos no site <http://www.esalq.usp.br/tomato> (Protocolos > manual do modelo vegetal Micro-Tom – Cap. 1: Especificações da casa de vegetação e protocolos > manual do modelo vegetal Micro-Tom – Cap. 2: Plantio, irrigação e adubação).

2.3 TRATAMENTOS

Durante o cultivo das plantas, o mutante *jai1-1*, apresentou tamanho pequeno dos frutos em relação os demais genótipos (MT e *Nr*), por este motivo foram realizados dos experimentos distintos, onde no primeiro experimento utilizou-se o mutante *Nr* e a cultivar MT, e um segundo experimento com a cultivar MT e os mutantes *Nr* e *jai1-1*.

No primeiro experimento foi realizada a colheita dos frutos dia 21 de julho de 2016, com 94 dias após o transplântio. Para o segundo experimento foi realizada no dia 28 de julho de 2016, com 101 dias após o transplântio. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação característico de cada genótipo, definido pela coloração da epiderme.

Após a colheita, os frutos provenientes de cada genótipo (MT e *Nr* no primeiro experimento e MT, *Nr* e *jai1-1* no segundo experimento) foram selecionados quanto ao tamanho, ausência de injúrias mecânicas e estágio de maturação de modo a se obter lotes homogêneos de frutos, este procedimento foi realizado para os dois experimentos. Após a remoção do cálice, os frutos foram imersos em solução 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de hipoclorito de sódio por 5 minutos para desinfecção da superfície e, após este período, foram expostos à temperatura ambiente para secar, posteriormente foi realizada a aplicação exógena com 1-metilciclopropeno (1-MCP) nos frutos, que seriam os tratamentos (MT com 1-MCP, *jai1-1* com 1-MCP e *Nr* com 1-MCP).

O 1-MCP é um gás que pode inibir ou retardar a ação do etileno, uma vez que compete com o etileno pelos sítios de ligação nos receptores das membranas (SISLER; SEREK, 1997).

Para o tratamento com 1-MCP, foi utilizado o produto SmartFresh® 0,14% de 1-MCP na formulação pó, na relação de 0,16g de produto por m^3 , para obter 1,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP. O produto foi pesado, colocado em um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado em água, posteriormente foi transferido para uma placa de Petri pequena e colocado dentro de uma caixa de 31L, juntamente com os frutos de MT, *Nr* e *jai1-1*. O período de tratamento dos frutos com 1-MCP foi de aproximadamente 18 horas, que segundo Cantu et al., (2009) é o período suficiente para o produto agir no fruto. A caixa lacrada com os frutos foi colocada em uma B.O.D, com temperatura média de 22°C. Os demais frutos que não tratados com 1-MCP (MT (controle), *Nr* sem 1-MCP e *jai1-1* sem 1-MCP) também foram acondicionados em uma caixa e colocados na B.O.D, para permanecerem na mesma temperatura que os frutos tratados.

2.4 INOCULAÇÃO DO FUNGO NOS FRUTOS

Após o período de 18 horas, foi realizada a inoculação *B. cinerea*. O fungo foi isolado (a partir de um fruto de morango com mofo cinzento) e mantido em meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Como foram dois experimentos, foram preparadas duas soluções, em função do número de frutos utilizados em cada um, com isso foram preparados 46 mL para o primeiro

experimento e 28 mL para o segundo experimento de solução na concentração de 10^5 esporos mL^{-1} . Para o preparo desta solução, os esporos do fungo foram misturados com 10 mL de água ultra pura, posteriormente foi realizada uma filtragem para retirar o excesso de massa de micélio e possíveis fragmentos do meio de cultura. Uma alíquota desta solução foi retirada para contagem do número de esporos em câmara de Neubauer, e a partir disso foi estimada a quantidade de água a ser adicionada para obter a solução na concentração desejada para inoculação nos frutos, através da equação: $C^1 \times V^1 = C^2 \times V^2$

Em que:

C^1 = Concentração inicial do número de esporos

V^1 = Quantidade inicial de água

C^2 = Concentração final do número de esporos

V^2 = Quantidade de água a ser adicionada





Posteriormente foram realizadas quatro lesões na região equatorial de cada fruto. Nestas lesões, foram adicionados 50 μL de solução contendo *B. cinerea* na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} (AQUINO et al., 2012). Os frutos foram armazenados em B.O.D a 21°C no primeiro experimento e a 25°C no segundo experimento ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) com umidade relativa do ar de 80% ($\pm 5\%$), durante seis dias para o primeiro experimento e três dias para o segundo experimento.

2.5 VARIÁVEIS ANALISADAS

A suscetibilidade dos frutos foi avaliada através da contagem do número de lesões desenvolvidas nos frutos e da medida do diâmetro de cada lesão. As avaliações para o primeiro experimento foram realizadas no terceiro, quarto e quinto dia após a inoculação de *B. cinerea* nos frutos e do segundo experimento foi no primeiro, segundo e terceiro dia após a inoculação do fungo, a fim de acompanhar a evolução dos sintomas da doença. Os dados obtidos foram representados como incidência, severidade e diâmetro médio das lesões em milímetros. A incidência representa o percentual de frutos com sintomas da doença e a severidade representa o número de lesões afetadas em cada fruto, sendo expressa como índice de 0 a 4, onde: 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3= três lesões e 4= quatro lesões com sintoma. Também foi realizada a porcentagem de diferentes sintomas da doença

por lesão. Os sintomas foram classificados como: escurecimento, micélio, micélio+escurecimento e escurecimento seco ao redor da lesão, como observado na Tabela 2.

Tabela 2. Diferentes sintomas observados nos frutos durante as análises.

Sintoma Observado	Imagem
Escurecimento	
Micélio	
Micélio+escurecimento	
Micélio seco ao redor da lesão	

2.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos para o primeiro experimento (MT (controle), MT com 1-MCP, *Nr* com 1-MCP e *Nr* sem 1-MCP) e quatro repetições, cada uma com dez frutos. Para o segundo experimento foram seis tratamentos (MT (controle), MT com 1-MCP, *Nr* com 1-MCP, *Nr* sem 1-MCP, *jai1-1* com 1-MCP e *jai1-1* sem 1-MCP), com cinco repetições cada e três frutos por repetição. A

verificação da distribuição normal dos dados obtidos foi dada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para dados onde não foi verificada a normalidade, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados com das variáveis analisadas que possuíam distribuição normal, foram submetidas à análise de variância (Anova) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% e 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento que os frutos foram armazenados a temperatura de 21° C, os primeiros sintomas começaram a serem observados somente no terceiro dia após a inoculação.

Foi observado analisando-se os dados obtidos, que ao bloquear o etileno em frutos de Micro-Tom, ocorre uma redução da incidência ao mofo cinzento, assim como no mutante *Nr* que é insensível ao etileno (tratado e não tratado com 1-MCP) em relação ao MT (controle) (Figura 1). O mesmo ocorre ao verificar-se a severidade da doença, onde o *Nr* (tratado e não tratado com 1-MCP) e o MT com etileno bloqueado apresentaram menor severidade quando comparados ao MT controle.

Ao verificar o diâmetro das lesões, os resultados demonstram que não há efeito do etileno na progressão da doença, uma vez que os diâmetros médios não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Figura 1).

Nos frutos do MT controle ocorreu maior porcentagem de micélio e do sintoma micélio+escurecimento, (Figura 2) em relação aos demais tratamentos (MT com 1-MCP, *Nr* com 1-MCP e *Nr* sem 1-MCP).

Gomes (2011) cita que por possuir uma mutação no domínio de ligação com etileno, o mutante de tomateiro *Nr* expressa uma proteína que não pode mais ser desligada pelo etileno, conferindo um fenótipo dominante insensível ao etileno, mesmo que os receptores normais sejam desligados pelo etileno os receptores mutantes continuam a sinalizar para a célula a supressão das respostas a este hormônio. Isto no primeiro experimento pode ser verificado, pois frutos de *Nr* apresentaram menor suscetibilidade à doença como citado anteriormente.

Foi observado por Brackmann e Freitas (2005) que com a aplicação de 1-MCP em frutos de maçãs, ocorreu um retardo na maturação e aumento do período de conservação de maçã Gala, além de redução na incidência de podridões pós-colheita. O mesmo pode ser observado neste trabalho, uma vez que os frutos de MT tratados com 1-MCP também apresentaram menor incidência ao fungo causador do mofo cinzento, que é responsável por consideráveis perdas antes e após a colheita de frutos.

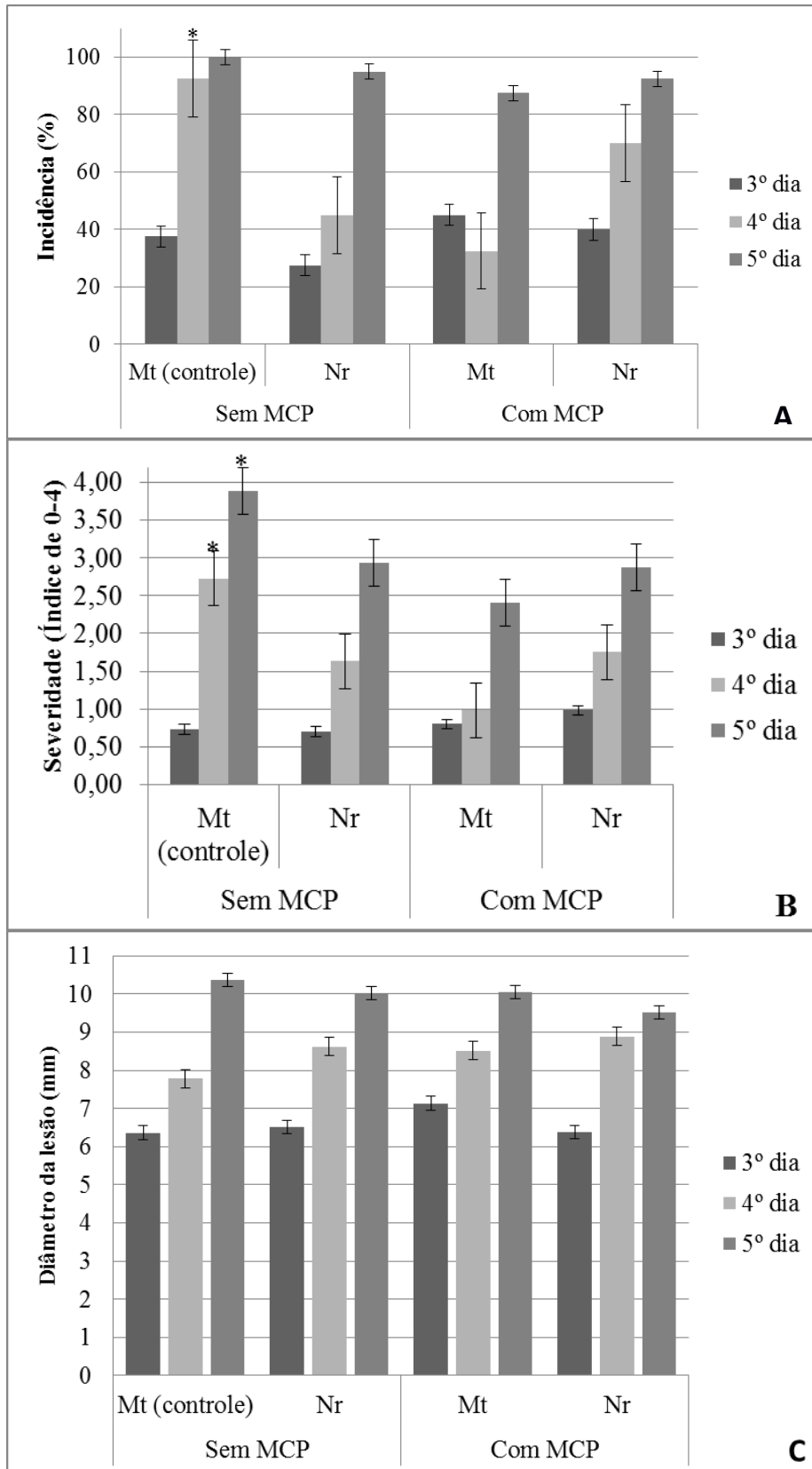


Figura 1. Suscetibilidade da cultivar MT e do mutante de tomateiro em etileno *Nr* ao fungo *Botrytis cinerea* após três dias de inoculação. (A) Incidência da doença, (*) diferença significativa dada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($01 \leq p < 0,05$); (B) Severidade da doença, medida pelo índice de severidade que vai de 0-4 (número de lesões

com sintoma): 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3=três lesões e 4= quatro lesões. (*) Diferença significativa dada pelo Kruskal-Wallis (p-valor>0,05) ao nível de 5% de probabilidade. (C) Evolução do Diâmetro das lesões. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4).

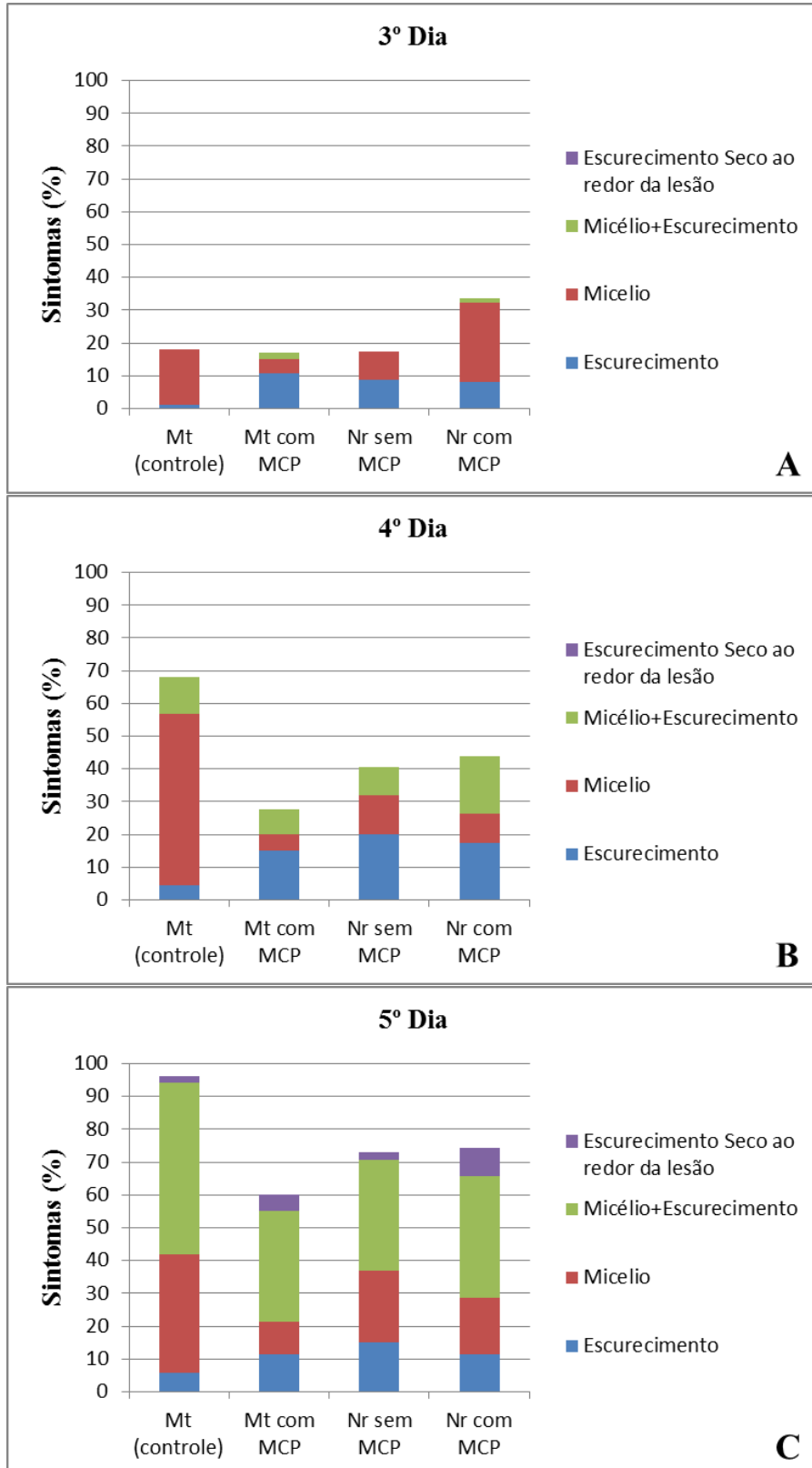


Figura 2. Porcentagem dos diferentes sintomas da doença ocorridos nas lesões após inoculação do fungo *Botrytis cinerea*, conforme a Tabela 2. (A) Terceiro dia após inoculação; (B) Quarto dia após inoculação; (C) Quinto dia após inoculação.

No segundo experimento em que os frutos foram mantidos a temperatura média de 25°C, no primeiro dia após a inoculação já foi possível observar-se os primeiros sintomas de incidência da doença.

Quanto aos dados avaliados do segundo experimento, os frutos do mutante *jai1-1* com 1-MCP apresentaram maior porcentagem de incidência a partir do segundo dia de avaliação (chegando a 100% de incidência) em relação aos demais tratamentos, porém não diferiu estatisticamente.

A severidade da doença que foi medida pelo número de lesões afetadas em cada fruto, o mutante *jai1-1* tratado com 1-MCP diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 4). Este mutante (com e sem 1-MCP) também apresentou a maior porcentagem de micélio (sintoma da doença) no segundo dia de avaliação após a inoculação do fungo (Figura 5).

Esses resultados demonstram que o mutante *jai1-1* apresenta alta suscetibilidade ao *B. cinerea*. Li et al., (2004) citam que o mutante *jai1-1* tem a perda de função na proteína F-box que é requerida no processo de sinalização de ácido jasmônico, por conta desta perda de função, mesmo produzindo ácido jasmônico, o mutante não é responsivo a ele, com isso os frutos ficam mais suscetíveis a estresses, principalmente bióticos como ataque de patógenos.

Glazebrook (2005) cita que a resistência ao patógeno necrotrófico *B. cinerea* é dependente da sinalização desencadeada pelos jasmonatos, mutações que bloqueiam a percepção do ácido jasmônico, como a que ocorre no mutante *jai1-1* causam aumento na suscetibilidade. Yu et al., (2009) observaram que frutos de tomate tratados com aplicação exógena de metil jasmonato (MeJa) apresentaram redução nos sintomas de *B. cinerea*, pois o MeJa regula respostas de defesa e induz a resistência contra fungos patógenos.

O mutante *jai1-1*, quando tratado com 1-MCP apresenta maior suscetibilidade ao *B. cinerea*, isso sugere que o etileno e o ácido jasmônico interagem em respostas de defesa contra este patógeno. Na Figura 3 é demonstrado um esquema onde o fator de transcrição ERF1 é um elemento chave (dependente do etileno e do ácido jasmônico) na regulação de genes de defesa PRs, que são ativados quando ocorre a infecção por um patógeno necrotrófico, como o gene como o PDF 1.2 (LORENZO et al., 2003). Em resposta ao ataque do patógeno, a expressão induzida do PDF 1.2 requer o etileno e o ácido jasmônico (FARMER; ALMERAS; KRISHNAMURTHY, 2003, GUO; ECKER, 2004).

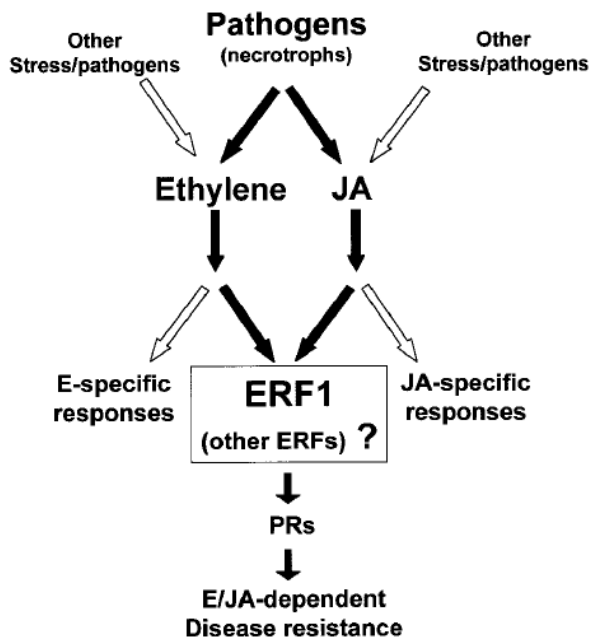


Figura 3. Esquema de sinalização do etileno e ácido jasmônico em *Arabidopsis* em resposta ao ataque de patógenos necrotróficos (LORENZO et al., 2003).

Outro resultado encontrado foi que o MT controle apresentou, maior diâmetro das lesões (Figura 4), diferentemente do resultado encontrado no primeiro experimento, onde demonstrou que não ocorria influência do etileno na progressão da doença. Isso pode ter ocorrido por os frutos dos dois experimentos terem sido mantidos após a inoculação em temperaturas de armazenamento diferentes (21° C para o primeiro experimento e 25° C para o segundo experimento).

A temperatura de armazenamentos dos frutos influenciou também na incidência da doença, pois no primeiro experimento os primeiros sintomas começaram a serem observados somente no terceiro dia após a inoculação, já no segundo experimento, onde os frutos foram mantidos em uma temperatura maior (25° C), no primeiro dia após a inoculação foi possível observar-se os primeiros sintomas da doença. Silveira et al., (2001) observaram que frutos incubados a temperatura média de 25° C apresentavam maior incidência de doenças, ou seja, esta é uma temperatura ótima para o patógeno infestar o hospedeiro.

Neste trabalho verificou-se que os hormônios vegetais podem alterar a suscetibilidade do tomate ao fungo *Botrytis cinerea*. Também foi verificado que pode ocorrer interação entre os dois hormônios (etileno e ácido jasmônico) em respostas de defesa contra fungos necrotróficos.

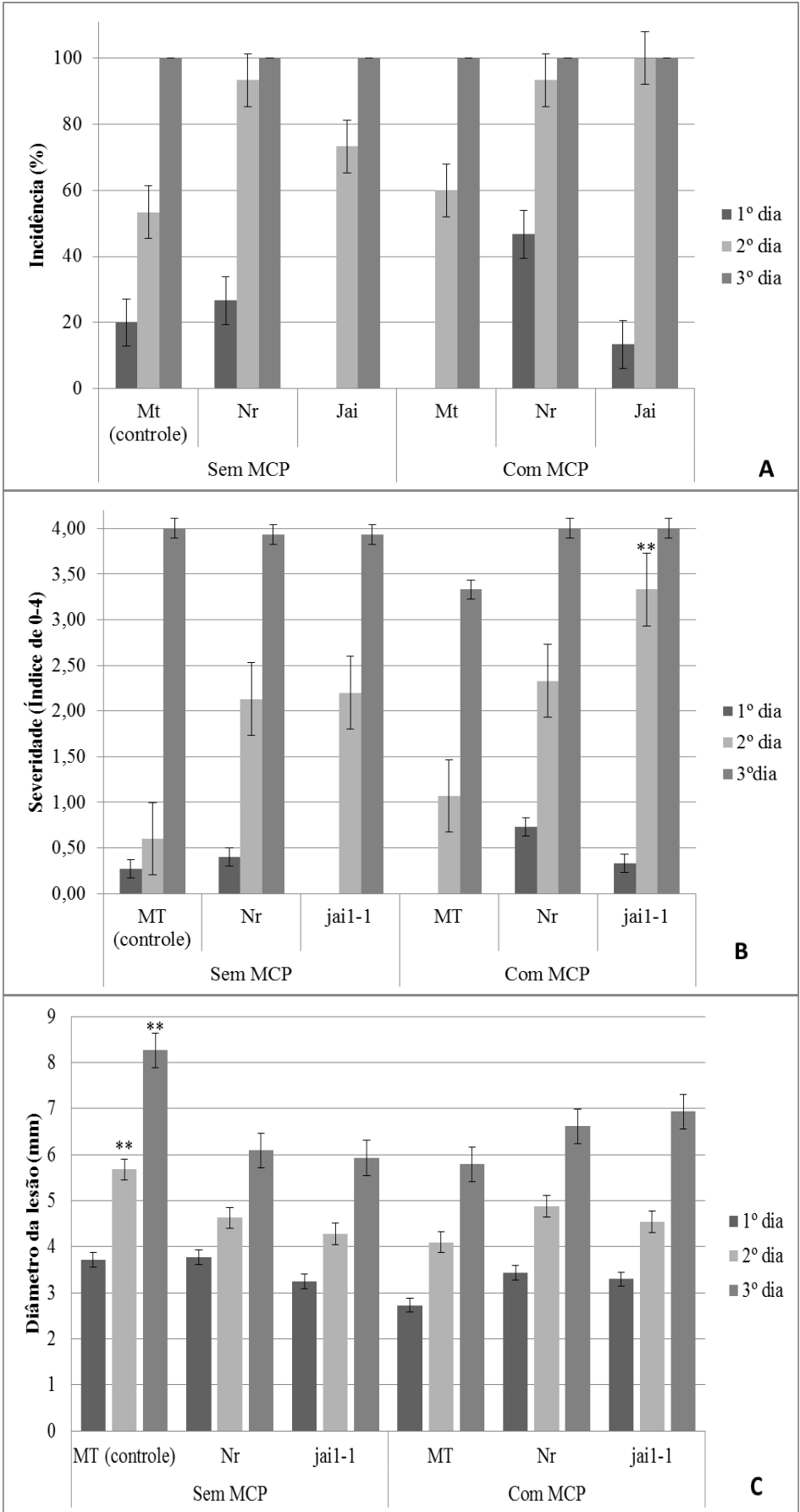


Figura 4. Suscetibilidade da cultivar MT e dos mutantes de tomateiro em etileno *Nr* e em ácido jasmônico *jai1-1*, ao fungo *Botrytis cinerea*. **(A)** Incidência da doença; **(B)** Severidade da doença, medida pelo índice de severidade que vai de 0-4 (número de lesões com sintoma): 0= nenhuma lesão; 1= uma lesão; 2= duas lesões; 3=três lesões e 4= quatro lesões. (**) Diferença significativa dada pelo Kruskal-Wallis ao nível de 1% de probabilidade (p -valor < 0.01) e ao nível de 5% de probabilidade (p -valor>0,05). **(C)** Evolução do Diâmetro das lesões. (**) Diferença significativa dada pelo teste de Tukey ao nível 1% de probabilidade (p <.01) e de 5% de probabilidade ($01=<p<.05$). Barras verticais indicam o erro padrão (n=6).

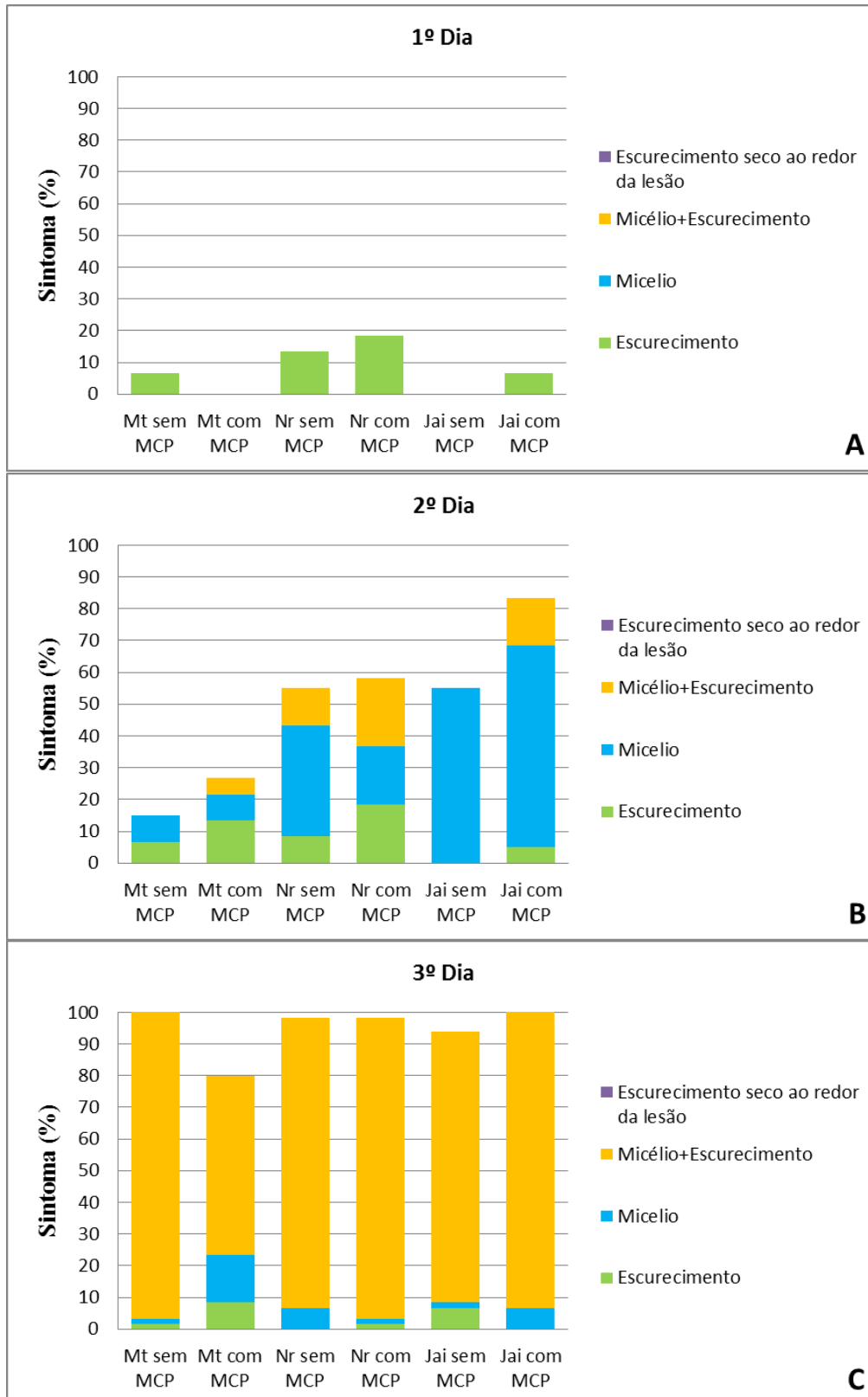


Figura 5. Porcentagem dos diferentes sintomas da doença ocorridos nas lesões após inoculação do fungo *Botrytis cinerea*, conforme a Tabela 2. (A) Primeiro dia após inoculação; (B) Segundo dia após inoculação; (C) terceiro dia após inoculação.

4 CONCLUSÕES

O etileno favorece a suscetibilidade do tomateiro ao *B. cinerea*.

O bloqueio da percepção do etileno em frutos insensíveis ao ácido jasmônico torna-os mais suscetíveis ao *B. cinerea*.

Há influência direta da temperatura na incidência e progressão da doença.

Influence of ethylene and jasmonic acid on the defense of tomato fruit against fungi causing gray mold

Patrícia Graosque Ulguim Züge

Abstract

The fungi *Botrytis cinerea* is one of the main causes of losses in the post-harvest of various fruits and vegetables, as it can cause damage in all parts of the plant. To study the role of ethylene and jasmonic acid in the susceptibility of the tomato fruit to the fungus *Botrytis cinerea* we used the cultivar Micro-Tom and the mutants *Nr* that is insensitive to ethylene and *jai1-1* that is insensitive to the jasmonic acid. Two experiments were carried out, the first using the cultivar MT and the mutant *Nr*, with storage temperature of the inoculated fruits of 21° C (± 0.5 ° C). In the second experiment, the cultivar MT and the mutants *Nr* and *jai1-1* were used with storage temperature of the fruits after inoculation of 25° C (± 0.5 ° C). The fruits of each genotype were injured in the equatorial region and inoculated with the fungus *Botrytis cinerea* (10^5 spores/mL⁻¹), the susceptibility represented by the incidence, severity and diameter of the lesion was evaluated. The experimental design was completely randomized, with four treatments for the first experiment: MT control (without 1-MCP), *Nr* without 1-MCP, MT and *Nr* with 1-MCP, each treatment contained four replicates with ten fruits each. For the second experiment, six treatments were MT (control), *jai1-1* and *Nr* without 1-MCP, *jai1-1* with 1-MCP, *Nr* with 1-MCP and MT with 1-MCP, each treatment with five replicates of three fruits. The results demonstrate the blockade of ethylene in the fruits of the MT cultivar reduces the incidence and severity of the disease. This reduction also occurred in the fruits of the *Nr* tomato mutant independent of the application of 1-MCP, indicating that ethylene favors incidence and severity. Another fact observed was that the fruits of the mutant insensitive to jasmonic acid showed high susceptibility to the disease and this susceptibility was even greater in the fruits of *jai1-1* when treated with 1-MCP. With these results, it was possible to demonstrate that there is interaction between the jasmonic acid and ethylene, and that these two hormones are involved in the defense responses against necrotrophic fungi, but more studies are needed to elucidate how this interaction occurs, using double mutants between The ethylene and the jasmonic acid with the cultivar Micro-Tom of tomato as genetic “background”.

Keywords: Micro-Tom. Vegetable hormones. Necrotrophic fungi.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, Marco Antônio Rezende. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA. 393 p, 2004.
- AQUINO, César Fernandes; SALES, Nilva de Lima Pereira; SOARES, Eriksen Patric Silva; MARTINS, Ernane Ronie. Ação e caracterização química de óleos essenciais no manejo da antracnose do maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.4, p.1059-1067, 2012.
- BRACKMANN, Auri; FREITAS, Sérgio Tonetto. Efeito do 1-mcp (1–metilciclopropeno) na qualidade pós-colheita de maçãs cultivar gala em diferentes estádios de maturação. **Revista da FZVA, Uruguaiana**, v.12, n.1, p. 44-52, 2005.
- CANTU, Dario; BLANCO-ULATE, Barbara; YANG, Liya; LABAVITCH, John M.; BENNETT, Alan B.; POWELL, Ann L. T. Ripening-Regulated Susceptibility of Tomato Fruit to Botrytis cinerea Requires NOR But Not RIN or Ethylene. **Plant Physiology**, v. 150, p. 1434–1449, July, 2009.
- CAMPOS, Marcelo Lattarulo. **Controle Hormonal da Defesa à Herbivoria em Tomateiro**. 2009.
Dissertação (mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- CAMPOS, Marcelo Lattarulo; ALMEIDA, Marcílio; ROSSI, Mônica Lanzoni; MARTINELLI, Adriana Pinheiro; LITHOLDO JUNIOR, Celso Gaspar; FIGUEIRA, Antonio; RAMPELOTTI-FERREIRA, Fátima Teresinha; VENDRAMIM, José Djair; BENEDITO, Vagner Augusto; PERES, Lázaro Eustáquio Pereira. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.4347-4361, 2009.
- CARVALHO, Rogério F.; CAMPOS, Marcelo Lattarulo; PINO, Lilian E.; CRESTANA, Simone L.; ZSÖGÖN, Agustin; LIMA, Joni E.; BENEDITO, Vagner A.; PERES, Lázaro Eustáquio Pereira. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: Micro-Tom as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, v. 7, p. 18, 2011.
- FARMER, Edward E.; ALMÉRAS, Emmanuelle; KRISHNAMURTHY, Venkatesh. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 372–378, 2003.
- GLAZEBROOK, Jane. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 205-227, 2005.
- GOMES, Ana Maria Figueira. **Interações hormonais no crescimento de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob estresse osmótico**. 2011.
Dissertação (mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

GUO, Hongwew; ECKER, Joseph R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7: p. 40–49, 2004.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. Rio de Janeiro, v.29, n.3, p.1-79, Março, 2016. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201501.pdf. Acesso em: 17 setembro 2016.

JARVIS, W. R. Managing Diseases in Greenhouse crops. **Plant Disease**, v. 73, n. 3, p. 190-194, 1989.

KLUGE, Ricardo Alfredo; NACHTIGAL, Jair Costa; FACHINELLO, José Carlos; BILHALVA, Aldonir Barreira. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. 2.Ed. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2002.

LI, Lei; ZHAO, Youfu; MCCAIG, Bonnie C.; WINGERD, Byron A.; WANG, Jihong; MARK, E. Whalon; PICHERSKY, Eran; HOWE, Gregg A. The tomato homolog of CORONATINE INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate signaled defense responses, and glandular trichome development. **The Plant Cell**, v.16, p. 126-143, 2004.

LIN, Zhefeng; ZHONG, Silin; GRIERSON, Don. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3311-3336, Jun, 2009.

LOPES, Carlos Alberto; REIS Airton. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Curricular técnica 100- Embrapa**. 2ª edição, Brasília-DF. Dezembro,2011. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/bbelectronica/2011/ct/ct_100.pdf. Acesso em: 26 setembro 2015.

LORENZO, Oscar; PIQUERAS, Raquel; SANCHEZ-SERRANO, José J.; SOLANO, Roberto. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 165–178, 2003.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, v.12, p. 1465-1472, 1997.

MONTEIRO, Carolina Cristina. **Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)* submetido aos estresses por cádmio e salinidade**. 2010. Dissertação (mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ROHWER, C. L.; ERWIN, J. E. Horticultural applications of jasmonato: a review. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 83. n. 3. p. 284-304, 2008.

SEAB (Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento). **Olericultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. DERAL - Departamento de Economia Rural, dezembro, 2012. Disponível em:<

http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/olericultura_2014_15.pdf>. Acesso em: 16 julho 2016.

SEBRAE. **Agronegócio Fruticultura**. Boletim de inteligência, outubro, 2015. Disponível em:<

[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)>. Acesso em: 16 julho 2016.

SILVEIRA, Norma S. S.; MICHEREFF, Sami J.; MARIANO, Rosa L. R.; TAVARES, Luciana A.; MAIA, Leonor C. Influência da temperatura, período de molhamneto e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, Brasília, Março, 2001.

SISLER, E.C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, p.577-582, 1997.

SOARES, Alexandra Martins dos Santos; MACHADO, Olga Lima Tavares. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revesta Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9-18, 2007.

THALER, Jennifer S.; OWEN, Blythe; HIGGINS, Verna J. The Role of the Jasmonate Response in Plant Susceptibility to Diverse Pathogens with a Range of Lifestyles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 530–538, May 2004.

TÖFOLI, J. G.; FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R. J.; NOGUEIRA, E.M. C. *Botrytis* sp. em Espécies Hortícolas: Hospedeiros, Sintomas e Manejo. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.11-20, jan./jun., 2011.

WILKINSON, Jack Q.; LANAHAN, Michael B.; YEN, Hsiao-Ching; GIOVANNONI James J.; KLEE Harry J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. **Science**, v. 270, p.1807-1809, 1995.

YU, Mengmeng; SHEN, Lin; FAN, Bei; ZHAO, Danying; ZHENG, Yang; SHENG, Jiping. The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. **Postharvest Biology and Technology**, v.54. p. 153-158, 2009.

ZHAO, Y.; TU, K.; SHAO, X. F.; JING, W.; YANG, J. L.; SU, Z. P. Biological control of the post-harvest pathogens *Alternaria solani*, *Rhizopus stolonifer*, and *Botrytis cinerea* on tomato fruit by *Pichia guilliermondii*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 132-136, 2008.