

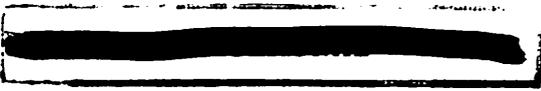


UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**RESISTÊNCIA SISTÊMICA ATIVADA PELO
ACIBENZOLAR-S-METIL CONTRA
DOENÇAS EM TOMATEIRO**

LUÍS HENRIQUE CARREGAL PEREIRA DA SILVA

2002



LAÇÃC 7 EMPRÉSTIM
C 7IÇÃC

52981

37511-MFN

LUÍS HENRIQUE CARREGAL PEREIRA DA SILVA

**RESISTÊNCIA SISTÊMICA ATIVADA PELO
ACETENZOLAR-S-METIL CONTRA DOENÇAS
EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL

2002

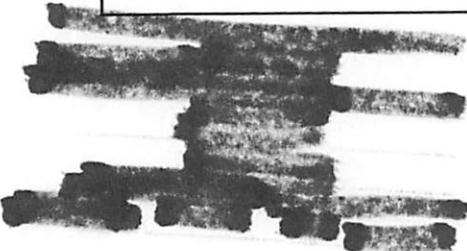
**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Luís Henrique Carregal Pereira da
Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doença em
tomateiro / Luís Henrique Carregal Pereira da Silva. -- Lavras : UFLA, 2002.
89 p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Resistência sistêmica adquirida. 2. Tomate. 3. Mancha bacteriana. 4.
acibenzolar-S-metil. 5. Peroxidase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.64292



LUÍS HENRIQUE CARREGAL PEREIRA DA SILVA

**RESISTÊNCIA SISTÊMICA ATIVADA PELO
ACIBENZOLAR-S-METIL CONTRA DOENÇAS EM
TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

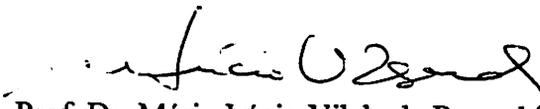
APROVADA em 31 de janeiro de 2002

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu

UFLA


Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2002

DEDICATÓRIA

**Ao meu pai, Hélio Pereira da Silva Júnior,
minha mãe, Cilaine Carregal Pereira da Silva
e à minha namorada, Juliana Resende Campos**

Ofereço

A

Ana Luiza Carregal Resmini

Giulia Carregal Resmini

Paolo Resmini

Hélio Pereira da Silva

e meus familiares

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelos pais que tenho.

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus familiares, que sempre acreditaram em mim.

Ao professor Dr. Vicente Paulo Campos, que sempre me incentivou e mostrou o caminho a seguir.

Ao professor Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende e ao professor Dr. Ricardo Magela de Souza, pela orientação, oportunidade e confiança.

Ao professor Dr. Mário Sobral de Abreu, pela amizade e por participar da banca de dissertação.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos.

Ao Roberto M. de Castro, da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., pela confiança e apoio nos trabalhos realizados.

Ao amigo Gutemberg Barone de Araújo Nojosa, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos meus colegas de turma Daniel, Marcos Roberto, Cristiano, Moab, Vanússia, Deila, Florisvalda, Ricardo e Graciela.

A Delourdes, Leísa, Ana, Elô, Marcos, Edson e demais laboratoristas e funcionários do Departamento de Fitopatologia, que sempre nos auxiliaram.

Ao Núcleo de Estudos em Fitopatologia, pelas oportunidades.

Aos bolsistas de iniciação científica e estagiários do laboratório de Fisiologia do Parasitismo, e em especial a Gilvane, Hernani e ao Leonardo, que tanto colaboraram na condução dos experimentos.

Ao bibliotecário Luiz Carlos de Miranda pelo preparo da ficha catalográfica.

A todos que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii

CAPÍTULO 1: Resistência sistêmica adquirida como uma ferramenta adicional ao manejo integrado de doenças em tomateiro

1 Introdução geral	2
2 Referencial teórico	4
2.1 Histórico	4
2.2 Resistência Sistêmica Adquirida	5
2.3 Importância do ácido salicílico na resistência induzida	7
2.4 Resistência Sistêmica Adquirida biologicamente	9
2.5 Resistência Sistêmica Adquirida quimicamente	10
2.6 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) x Resistência Sistêmica Induzida (ISR)	12
2.7 Mecanismos envolvidos na indução de resistência	13
2.8 Propriedades e características do acibenzolar-S-metil	15
2.9 Efeito “in vitro” do acibenzolar-S-metil (ASM) sobre microrganismos	15
3 Referências bibliográficas	17

CAPÍTULO 2: Efeito comparativo do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erysiphe cichoracearum* e *Septoria lycopersici*.

1 Resumo	24
2 Abstract	25
3 Introdução	26

4 Material e métodos	29
4.1 Produção de mudas	29
4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação	29
4.3 Montagem do ensaio e avaliação	30
5 Resultados e discussão	32
6 Conclusões	39
7 Referências bibliográficas	40

CAPÍTULO 3: Época, modo de aplicação e doses de manutenção do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiro

1 Resumo	44
2 Abstract	45
3 Introdução	46
4 Material e métodos	48
4.1 Produção de mudas	48
4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação	48
4.3 Escala de avaliação utilizada nos experimentos	49
4.4 Montagem do ensaio e avaliação	49
4.4.1 Experimento 1: Efeito de épocas e modo de aplicação do ASM na severidade da mancha bacteriana	49
4.4.2 Experimento 2: Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha bacteriana	50
5 Resultados e discussão	52
5.1 Experimento 1: Efeito de épocas e modo de aplicação do ASM na severidade da mancha bacteriana	52
5.1.1 Época de aplicação do ASM	52
5.1.2 Modo de aplicação do ASM	54

5.2 Experimento 2: Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha bacteriana	54
6 Conclusões	57
7 Referências bibliográficas	58

CAPÍTULO 4: Resistência induzida pelo acibenzolar-S-metil em cinco genótipos de tomateiro, para processamento industrial, contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

1 Resumo	61
2 Abstract	62
3 Introdução	63
4 Material e métodos	65
4.1 Produção de mudas	65
4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação	65
4.3 Escala de avaliação utilizada no experimento	66
4.4 Montagem do ensaio e avaliação	66
5 Resultados e discussão	68
6 Conclusão	71
7 Referências bibliográficas	72

CAPÍTULO 5: Mecanismos de ação do acibenzolar-S-metil em tomateiro contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

1 Resumo	75
2 Abstract	76
3 Introdução	77
4 Material e métodos	79
4.1 Produção de mudas	79
4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação	79

4.3 Experimento 1: Efeito “in vitro” do ASM <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	79
4.4 Experimento 2: Atividade de peroxidase em plantas tratadas ou não com ASM	80
5 Resultados e discussão	82
5.1 Efeito “in vitro” do ASM sobre <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	82
5.2 Atividade de peroxidase em plantas tratadas ou não com ASM	82
6 Conclusões	85
7 Referências bibliográficas	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB	Ácido benzóico
AB2H	Ácido benzóico 2-hidrolase
Abs	Absorbância
AS	Ácido salicílico
ASM	Acibenzolar-S-metil
CV	Coefficiente de variação
HR	Reação de hipersensibilidade
i. a.	Ingrediente ativo
INA	Ácido 2,6 di-cloro isonocotínico
ISR	Resistência sistêmica induzida
min.	Minutos
nm	Nanômetros
PAL	Fenilalanina amônia-liase
SAR	Resistência sistêmica adquirida
<i>t</i>-CA	Ácido transcinâmico
ufc	Unidades formadoras de colônias
°C	Graus Celsius

RESUMO

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. Lavras: UFLA, 2002. 89p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Com o intuito de avaliar as perspectivas da indução de resistência em tomateiro contra patógenos, pelo uso do acibenzolar-S-metil (ASM), experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil. O ASM é um indutor de resistência liberado comercialmente em alguns países. No Brasil, foi recentemente registrado junto ao Ministério da Agricultura e Abastecimento. Foram avaliados épocas, doses e modo de aplicação do produto, bem como mecanismos de defesa ativados. A resistência induzida pelo ASM foi avaliada em diferentes cultivares contra diversos patógenos. A proteção conferida contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foi significativamente maior em relação à testemunha para todas as cultivares avaliadas, tanto quando o produto foi aplicado via pulverização foliar quanto via irrigação no solo. A proteção conferida pela aplicação do ASM foi também efetiva contra oídio, mas requer reaplicações em intervalos de tempo inferior a treze dias. Contra *Septoria lycopersici* o tratamento com ASM não foi eficaz na dose de 2,5 g do ingrediente ativo/100 L de água. O ASM comportou-se como um indutor de resistência contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, uma vez que o mesmo não apresentou efeito direto sobre esse patógeno em concentrações até 1000 ppm. Entre os possíveis mecanismos de defesa ativados, foi avaliada a atividade de peroxidase em plantas tratadas ou não com o ASM. As plantas tratadas com ASM apresentaram aumentos significativos na atividade dessa enzima a partir de 12 horas após o tratamento, permanecendo até onze dias, com pico na atividade 24 horas após o tratamento com ASM. Isso sugere que a lignificação está possivelmente envolvida na resposta de defesa do tomateiro contra essa bactéria.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Systemic resistance triggered by acibenzolar-S-methyl against diseases on tomato. Lavras: UFLA, 2002. 89p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Aiming at evaluating the perspectives of the induction of resistance in tomato against pathogens by acibenzolar-S-methyl (ASM), experiments were carried out in a greenhouse at the Department of Phytopathology of the Federal University of Lavras, MG, Brazil. ASM is a resistance inducer sold in some countries, being recently registered by the Ministry of Agriculture and Food Supply in Brazil. Doses, times and modes of application of the product, as well as defense mechanisms activated, were assessed. Resistance induced by ASM was evaluated in different cultivars against several pathogens. The protection against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* was significantly higher in relation to the control for all assessed cultivars at both modes of application, foliar spraying or soil drenching. The protection conferred by ASM was also effective against powdery mildew, but it requires re-applications in time intervals inferior to thirteen days. The treatment with ASM at 2.5 g of active ingredient/ 100L was not effective against *Septoria lycopersici*. ASM behaved as a resistance inducer against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, since it did not present direct toxic effect on that pathogen at concentrations up to 1000 ppm. Amongst the possible defense mechanisms activated against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, peroxidase activity was evaluated in plants treated or not with ASM. Treated plants presented significant increases in the activity of that enzyme, from 12 hours up to eleven days, peaking at 24 hours after ASM application. It is suggested that lignification is possibly involved in the tomato defense response against that bacteria.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

CAPÍTULO 1

**Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) como uma ferramenta adicional ao
manejo integrado de doenças em tomateiro**

1 INTRODUÇÃO GERAL

As plantas apresentam-se como alvo potencial de milhares de microrganismos fitopatogênicos. Entretanto, a ocorrência de relações parasíticas estáveis entre um microrganismo patogênico e seu hospedeiro suscetível na presença de ambiente favorável (doença) é uma exceção. Assim, a resistência de plantas a doenças é a regra. Tal fato é devido às inúmeras barreiras de defesa que as plantas apresentam, bem como pela especificidade das interações patógeno-hospedeiro.

A resistência em plantas pode ser definida como a capacidade da planta em evitar ou atrasar a entrada e a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (Pascholati & Leite, 1995).

Segundo Agrios (1997), as plantas podem se defender de patógenos por meio de barreiras pré e pós-formadas, as quais podem ser estruturais ou bioquímicas. As barreiras pré-formadas são aquelas existentes na planta antes da chegada do patógeno ao seu hospedeiro. As barreiras pós-formadas são aquelas que estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidas ou ativadas em resposta à presença do patógeno, como no caso de resistência sistêmica adquirida (SAR).

Embora possam se defender de patógenos, muitas vezes as plantas não ativam seus mecanismos em tempo hábil, no local correto e na quantidade certa, o que faz com que a doença ocorra. É por isso que pesquisadores envolvidos em defesa vegetal estão preocupados em buscar novas táticas de controle.

Antigamente, pensava-se que o controle químico resolveria todos os problemas fitossanitários, entretanto, não é o que está sendo observado. Além do mais, hoje em dia, preocupa-se muito em praticar uma agricultura sustentável que provoque o menor impacto possível ao meio ambiente. Portanto, não se

pode intervir no controle de doenças apenas com o controle químico, mesmo porque, em alguns casos, esse já não tem sido eficiente. É no âmbito dessa questão que a resistência induzida torna-se uma ferramenta fundamental para o manejo integrado de doenças e indispensável para uma nova agricultura, mais racional e sustentável. Isso devido à sua condição de amplo espectro e inespecificidade, podendo auxiliar no manejo de várias doenças na mesma cultura (Silva et al., 2000).

Assim sendo, o presente trabalho visou avaliar o efeito de épocas, modo de aplicação e doses de manutenção do acibenzolar-S-metil na indução de resistência em diferentes cultivares de tomate, contra vários patógenos, bem como seu efeito “in vitro” sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e os possíveis mecanismos de ação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

Os primeiros pesquisadores a estudar o fenômeno de resistência induzida foram Ray e Beauverie, ambos em 1901 no patossistema *Botrytis cinerea* X *Begonia* sp. (Kessman et al, 1994). Entretanto, naquela época, pouca atenção foi dada ao assunto.

Já em 1933, Chester (citado por Moraes, 1998) revisou cerca de duzentos trabalhos que tratavam da resistência de plantas a doenças e levantou a hipótese de que as plantas teriam um sistema imunológico semelhante ao dos mamíferos. Entretanto, vale salientar que as plantas não possuem células especializadas na resposta imune, não produzem anticorpos e, portanto, não possuem sistema imunológico.

Segundo Ryals et al. (1994), Ross, em 1961, foi o primeiro a caracterizar em detalhe a ocorrência de SAR em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) que exibiam lesões locais quando infectadas pelo vírus do mosaico do fumo (TMV). Este autor demonstrou que as lesões locais que ocorriam em fumo após a inoculação do TMV eram restringidas por uma inoculação prévia com o mesmo vírus. Tal restrição foi também efetiva contra diferentes patógenos como outros vírus, bactérias e fungos. Ross detectou a ocorrência de SAR três dias após a inoculação com o desafiador e observou que esta perdurou por várias semanas.

Acredita-se que os trabalhos de Ross tenham sido responsáveis por despertar a atenção dos pesquisadores para este assunto. A partir de então, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de compreender de forma efetiva tal fenômeno.

A partir da década de 1990, vários avanços foram obtidos nesta área, embora ainda não tenha sido explicada por completo. A biologia molecular,

principalmente com o uso de transgênicos de *Arabidopsis* sp., tem possibilitado elucidar, preferencialmente, rotas de sinalização, sinais envolvidos na resistência induzida, bem como os mecanismos de defesa ativados.

2.2 Resistência Sistêmica Adquirida

Em 1994, Ryals et al. relataram que SAR podia ser dividida em duas fases: iniciação e manutenção. Para estes autores, a fase de iniciação pode ser breve e inclui todos os eventos que comandam o estabelecimento da resistência. Já a fase de manutenção descreve a translocação da resistência que é resultado da iniciação. Porém, esses termos foram utilizados simplesmente para servir como definições operacionais e não para implicar em processos distintos.

Com estes conceitos, os autores buscaram facilitar o entendimento de como o fenômeno de SAR acontece. Tal separação se mostra necessária, uma vez que vários eventos estão envolvidos na indução de SAR e a elucidação dos mesmos poderá fornecer subsídios para que novas tecnologias sejam desenvolvidas.

Posteriormente, Moraes (1998) relatou que são três as etapas importantes na ativação de SAR e que estas podem ser identificadas como: iniciação, transmissão de sinais e expressão gênica.

É sabido que a iniciação ocorre a partir da interação do patógeno com o hospedeiro, seja ela compatível ou incompatível, geralmente com a formação de lesões necróticas (reação de hipersensibilidade-HR) nos tecidos do hospedeiro. A iniciação, no caso de SAR, também pode ocorrer pela exposição da planta a um agente indutor abiótico.

Poucos minutos após o início da interação patógeno-hospedeiro, uma série de eventos bioquímicos é observada nas células vegetais. Entre os quais, citam-se o fluxo de íons através da membrana celular, alteração dos estados de

fosforilação, geração de radicais de oxigênio ativo, rearranjo de estruturas intracelulares e o desenvolvimento de HR (Moraes, 1998).

Após a iniciação é necessário que ocorra a transmissão dos sinais que induzirão a síntese de compostos de defesa, mesmo em locais distantes do ponto de contato, por meio da expressão gênica.

O modo como essa transmissão é realizada intrigou e ainda intriga vários pesquisadores, já que as plantas não possuem um sistema circulatório para transportar grandes quantidades de compostos de defesa que atuam contra patógenos. Sabe-se que as plantas utilizam moléculas transmissoras de sinais, as quais, mesmo em baixas concentrações, podem ativar mecanismos de resistência em células não diretamente invadidas por patógenos. Diversas moléculas têm sido postuladas como sinais potenciais para ativar SAR (Moraes, 1998). Entretanto, desconfia-se que o ácido salicílico (AS), um produto do metabolismo dos fenilpropanóides, tenha um papel fundamental nessa transmissão, embora não se saiba se realmente é o AS o sinal que transloca.

Por conseguinte à transmissão dos sinais, é necessário que a plantas expressem seus genes de defesa, como resposta ao ataque de patógenos ou à exposição a um agente indutor.

Alguns genes de plantas são também expressos devido à presença de patógenos no local da infecção, tais como genes de enzimas da via de fenilpropanóides, enquanto outros são ativados no local e sistemicamente, sendo geralmente associados a SAR (Heitz et al., 1994, citado por Moraes, 1998). Estes últimos são denominados genes SAR. Os genes SAR podem codificar diferentes moléculas (enzimas e proteínas) que irão atuar na defesa da planta contra o patógeno. Os genes SAR são normalmente organizados em famílias gênicas que apresentam um padrão de expressão bastante complexo entre seus membros. Muitos estudos indicam que pelo menos alguns dos genes ativados durante SAR possuem seqüências regulatórias comuns. Entretanto, a função

destes genes na resistência aos patógenos ainda não foi bem estabelecida (Moraes, 1998).

2.3 Importância do ácido salicílico na indução de resistência

Rasmussen et al. (1991) avaliaram a indução sistêmica do acúmulo de AS em pepino após a inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plantas de pepino com duas folhas verdadeiras foram inoculadas, através da injeção de suspensão bacteriana na concentração de 10^8 ufc/mL, em cinco locais de cada folha. Foi coletado o exsudato do floema de plantas inoculadas com esta bactéria 0, 6, 12, 18 e 24 horas após a inoculação, sendo observado um aumento na quantidade de AS após 12 horas da inoculação. Já nas plantas controle, nenhum aumento na concentração de AS foi observado, nem 48 horas após a inoculação.

Conti et al. (1996) desenvolveram trabalhos com o intuito de elucidar o possível envolvimento de AS na indução de SAR em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) contra *Sphaerotheca fuliginea*. Cotilédones de plantas de pepino que apresentavam duas folhas completamente expandidas foram inoculadas mecanicamente com uma suspensão purificada ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) do vírus da necrose do fumo (TNV) em tampão fosfato. As plantas controle foram inoculadas apenas com o tampão fosfato. Em resultado à inoculação foi detectado, através de análise cromatográfica, que o nível endógeno do AS nas primeiras folhas verdadeiras de plantas inoculadas com TNV aumentou continuamente a partir do segundo até o quinto dia, quando estas folhas foram inoculadas com *S. fuliginea*. Nas plantas controle, o nível de AS permaneceu indetectável em cada análise.

Delaney (1997) relata que a evidência da importância do AS em SAR vem de experimentos com plantas transgênicas que apresentam o gene

bacteriano *nahG*, o qual codifica a enzima salicilato hidroxilase. Esta enzima catalisa a transformação do AS em um composto inativo, o catecol. Plantas que expressam essa enzima não são capazes de acumular AS após o ataque de patógenos e, conseqüentemente, são incapazes de ativar genes SAR ou desenvolver resistência contra patógenos (Gaffney et al., 1993).

Dada a importância do AS na resistência à doença, a rota de biossíntese do AS pode representar o principal ponto no controle das respostas de defesa da planta (Ryals et al, 1996). A rota biossintética de AS apresenta seu início com a conversão da fenilalanina a ácido transcinâmico (*t*-CA), sendo catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Tem sido proposto que a conversão do *t*-CA em AS ocorre pela diminuição da cadeia que produz o ácido benzóico (AB), seguido pela hidroxilação no carbono-2, derivando-o assim, em AS (Yalpani et al., 1993, citados por Ryals et al., 1996). O último passo é provavelmente catalisado pela citocromo P₄₅₀ monoxigenase, denominado ácido benzóico 2-hidroxilase (AB2H), cuja atividade é induzida tanto pela infecção quanto pela aplicação exógena de AB (León et al., 1993, citados por Ryals et al., 1996). Devido ao AB exógeno causar o acúmulo de AS, mas não o de *t*-CA, parece plausível que o passo limitante na biossíntese de AS seja a conversão do AB, embora existam outras possibilidades (Ryals et al., 1996).

O mecanismo de produção do AB a partir do *t*-CA é desconhecido, mas pode ocorrer de maneira similar à β -oxidação de ácidos graxos. A evidência para a β -oxidação de *t*-CA em AB vem de estudos realizados em *Quercus pedunculata*, mostrando que acetil-CoA e ATP estimulam a formação de AS a partir de *t*-CA em extratos de células livres (Alibert & Ranjeva, 1971, citados por Ryals et al., 1996).

AB e AS recém-sintetizados são rapidamente convertidos para a forma conjugada com glicose (Ennyedi & Raskin, 1993, citados por Moraes, 1998). Este pode ser um importante nível de regulação dos teores de AS. Em plantas

sadias de fumo existe uma grande quantidade de AB conjugado que diminui transitoriamente após a infecção (Ryals et al., 1996). A diminuição dos níveis de AB conjugado está correlacionada com o aumento de AB livre e AS (Yalpani et al., 1993, citado por Ryals et al., 1996). Uma vez que AS é acumulado, este é rapidamente convertido a ácido β -O-D-glucosilsalicílico (SAG), que aparentemente não é ativo na resistência à doença (Leon et al., 1993, citados por Ryals et al., 1996). A conversão de SAG em AS livre representa outro mecanismo potencial para aumentar os níveis de AS livre (Ryals et al., 1996).

2.4 Resistência Sistêmica Adquirida biologicamente

As moléculas naturais utilizadas como indutores de respostas de defesa são geralmente oligossacarídeos da parede celular de patógenos como glucanas, derivados de quitina, glicoproteínas, peptídeos e polissacarídeos da parede celular vegetal (Hann, 1996).

Uma outra área de estudo que vem apresentando grandes avanços é a indução de resistência por microrganismos vivos, principalmente por bactérias classificadas como "Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas" (PGPR's) (Romeiro, 2000). A maneira como estes organismos atuam sobre patógenos ainda parece estar indefinida.

Embora seja eficiente, a SAR induzida biologicamente e de forma natural, apresenta algumas desvantagens no campo. A indução, por exemplo, pode ocorrer esporadicamente e não obrigatoriamente em toda área, o que pode resultar em rendimentos e qualidade não adequados.

2.5 Resistência Sistêmica Adquirida quimicamente

Entre as substâncias abióticas capazes de induzir resistência, o ácido salicílico (AS) e seus análogos, como, por exemplo, o [sulfo-metil-éster do ácido benzo (1,2,3) thiadiazole-7- carbotióico] (ASM) e o ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) destacam-se como algumas das mais importantes. Entretanto, tanto o AS quanto o INA são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas e, portanto, não possuem potencial para uso comercial. Sticher et al. (1997) relatam que substâncias sintéticas também podem induzir resistência, tais como o propenazole (Oryzmate®) e o ácido 2,2 dicloro 3,3 dimetilciclopropano carboxílico (WL 28325), ambos contra *Magnaporthe grisea* em arroz; ácido DL-2 aminobutírico (BABA) na proteção contra *Phytophthora infestans* em tomate e batata e *Peronospora tabacina* em fumo. Além destas substâncias, os autores relatam que compostos inorgânicos, como sais fosforados, induzem resistência em feijão, pepino e milho.

Em 1989, pesquisadores da Ciba Geigy A.G., atual Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., descobriram que o acibenzolar-S-metil (ASM) é um eficiente indutor de SAR, sendo então considerado um ativador de defesa vegetal.

O ASM é, até o momento, o único indutor de SAR liberado para o uso comercial em alguns países (Knight et al., 1997). Sua utilização mostra-se muito interessante, porque é capaz induzir resistência mesmo em plantas incapazes de acumular AS (Delaney, 1997). Nos EUA, foi aprovada pelo United States Environmental Protection Agency (EPA) em abril de 2000, a comercialização de um novo indutor de resistência, o Messenger®. Trata-se de uma formulação química que contém 3% de harpina. Harpina é uma proteína bacteriana extracelular rica em glicina, capaz de ativar rotas metabólicas para respostas de defesa da planta. Foi inicialmente descoberta em *Erwinia amylovora*, sendo a

primeira molécula originada de um patógeno capaz de ativar HR (Cooper, 2001).

O Messenger® está sendo comercializado nos EUA, dentro de um programa de manejo integrado, para o controle de vírus, bactérias e fungos nas seguintes culturas: algodão, tomate, fumo, pimentão, citros, trigo e morango (Eden Bioscience, 2000). Além disso, os mecanismos de defesa ativados podem também ser efetivos contra alguns insetos-praga (Moffat, 2001). No Brasil, ainda não são encontrados, na literatura, estudos que comprovem sua eficácia e muito menos seu modo de ação.

Para ser considerado um ativador de SAR, um composto químico deve apresentar, no mínimo, três características: 1) o composto ou seus metabólitos não devem exibir atividade antimicrobiana direta (Sticher et al., 1997); 2) o produto deve induzir resistência sistêmica contra o mesmo espectro de patógenos que SAR ativada biologicamente; 3) o produto deve induzir à expressão dos mesmos genes marcadores, conforme SAR ativada por patógenos (Kessmann et al., 1994).

Por induzir os mecanismos de defesa da própria planta, o ASM propicia uma forte proteção das plantas contra patógenos. Segundo Kombrink et al. (1995), citados por Ruess et al., (1997) a maioria dos mecanismos de indução está localizada no sítio de tentativa de infecção do microrganismo, onde a planta responde primeiramente com a morte localizada de células (reação de hipersensibilidade – HR), seguida pela formação de metabólitos antimicrobianos, formação de calose e lignificação.

Para demonstrar que o ASM realmente atua de forma idêntica a um fenômeno biológico natural de SAR, vários estudos realizados por Ruess et al. (1997) demonstraram que:

- o ASM e seus metabólitos não apresentaram atividade direta contra os patógenos estudados;

- protegeu a planta contra o mesmo espectro de patógenos como na ativação biológica;
- promoveu as mesmas mudanças bioquímicas nas plantas como na ativação biológica;
- foi requerido um tempo mínimo entre a aplicação e a resposta de defesa produzida pela planta.

Em trabalho desenvolvido por Friedrich et al. (1996), plantas de fumo pré-inoculadas com TMV ou tratadas com ASM mostraram-se resistentes a *Cercospora nicotianae*, *Erwinia carotovora*, *Phytophthora parasitica*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e TMV. Estes autores observaram que, para os patógenos testados, o ASM induziu resistência e falhou na proteção contra os mesmos patógenos também observados com a pré-inoculação do TMV.

O ASM que, segundo Görlach et al. (1996), é um potente ativador de SAR, tem sido utilizado na Europa para o controle de doenças em cereais. Na Costa Rica, tem sido utilizado em bananeira para o controle da Sigatoka negra, em misturas com fungicidas como difenoconazole, mancozeb e tridemorf. Nos EUA, o produto está sendo comercializado principalmente para proteção contra doenças bacterianas em hortaliças (Novartis Crop Protection, 1997). No Brasil, o ASM foi recentemente registrado junto ao Ministério da Agricultura e Abastecimento, sob o nome comercial Bion®, para proteção contra doenças bacterianas em tomateiro, *Crinipellis pernicioso* em mudas de cacau e *Xyllela fastidiosa* em mudas de citros.

2.6 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) x Resistência Sistêmica Induzida (ISR)

Embora estes termos pareçam sinônimos, pesquisadores contemporâneos (Loon et al., 1998; Romeiro, 1999), concordam que SAR e ISR

são fenômenos distintos. Para estes autores, SAR e ISR diferem-se quanto à forma pela qual são induzidos e desencadeados, uma vez que estes são governados por mecanismos bioquímicos diferentes. Entretanto, como resultado fenotípico final, ambos se expressam sob a forma de indução de resistência sistêmica.

Em trabalhos recentes, vários autores (Métraux, 1998; Pieterse et al., 1998; Loon, 1998 e 1999), citados por Romeiro (1999), relatam que SAR envolve o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's) como mecanismos de defesa da planta, sendo sua indução dependente do AS. Neste caso, a indução de resistência pode resultar em alterações visuais (HR) na planta que sofreu indução, podendo ainda ser obtida por meio do tratamento com elicitores bióticos ou abióticos. No caso de ISR, alterações visuais não são perceptíveis, o agente indutor é um não-patógeno e a indução de defesa não é dependente do AS, parecendo haver uma outra rota de sinalização mais associada a jasmonatos e etileno.

2.7 Mecanismos envolvidos na indução de resistência

Segundo Chester (1993), citado por Resende et al. (2000), a resistência sistêmica adquirida envolve a ativação de mecanismos latentes de defesa, por meio do tratamento com agentes bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos (agentes químicos) (Inbar et al., 1998).

Entre os mecanismos de defesa ativados, podem ser citados o acúmulo de fitoalexinas, quitinases e β -1,3 glucanases (PRPs) (Loon & Antoniw, 1982), o aumento na atividade de peroxidases (correlacionado com o aumento de lignificação) e a formação de papilas (depósitos de lignina + calose).

Tem se verificado que plantas tratadas com um indutor de resistência (ASM), por exemplo, apresentam maior atividade das enzimas fenilalanina

amônia-liase e peroxidases após a inoculação com *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Stadnik, 1999). Por outro lado, no patossistema sorgo – *Colletotrichum graminicola*, em estudos conduzidos na ESALQ/USP, foi demonstrado que há indução na produção de fitoalexinas diretamente proporcional ao aumento da dose de ASM até o limite de 50 ppm. Ainda foram verificadas as enzimas glucanases e quitinases que, inesperadamente, apresentaram redução na atividade (Pascholati et al., 1999).

Em estudos realizados na UFLA, foi observada correlação positiva entre indução de resistência e atividade de peroxidases em cacau (Resende et al., 2000). Estes autores avaliaram os níveis de fenóis totais, polifenoloxidasas e peroxidases aos 3, 15 e 30 dias após a aplicação do ASM em plantas de cacau da cultivar Catongo, objetivando explicar seu mecanismo de ação. Foi observado que não houve diferença significativa no conteúdo de fenóis totais e na atividade de polifenoloxidasas. Entretanto, ocorreu um aumento significativo na atividade de peroxidases para todos os períodos avaliados, sugerindo possível envolvimento do ASM na síntese de lignina. Segundo Görlach et al. (1996), a ativação de resistência pelo ASM em trigo se dá pela indução dos genes chamados WCI (Wheat chemically induced), que incluem os genes que codificam uma lipoxigenase e proteínas ricas em enxofre. Isso indica que os mecanismos de atuação do ASM podem variar, dependendo do patossistema avaliado (Pascholati et al., 1999).

A exploração dos mecanismos de SAR possibilita uma alternativa ao uso de fungicidas para o controle de doenças de plantas, com o emprego de produtos ativadores de SAR.

Observações sugerem que efeitos colaterais do agente indutor possam, sob certas circunstâncias, afetar negativamente a fisiologia da planta e/ou que a indução de resistência tenha um custo energético para a planta (Pascholati et al., 1999).

Em contrapartida, devido ao seu modo de ação e ao fato de não apresentar toxicidade inerente, o risco de seleção de isolados dentro de uma população de patógeno pode ser considerado muito baixo (Pascholati et al., 1999).

2.8 Propriedades e características do acibenzolar-S-metil

O ASM é uma molécula exógena sinalizadora de reações de defesa que é rapidamente absorvida e translocada por toda a planta. Esta molécula gera um sinal no sítio de contato com o órgão vegetal, que posteriormente translocará para outros órgãos não expostos ao contato com esta, desencadeando uma série de eventos que ativarão genes de defesa.

Testado em vários organismos e microrganismos pela Ciba-Geigy em 1996, o ASM foi considerado como uma substância inofensiva ou praticamente não tóxica. Seus metabólitos não são carcinogênicos e mutagênicos. Quanto a sua toxicidade aguda, apresenta DL₅₀ oral > 5000 mg/kg; DL₅₀ dermal >2000 mg/kg; CL₅₀ inalação > 5000 mg/cm³, no caso de ratos. Para o coelho, foi considerado pouco irritante, levando-se em consideração irritação aos olhos e à pele (Bion, 2001). Segundo Lyon & Newton (1997), o ASM também causou sensibilização na pele de porquinho-da-índia.

2.9 Efeito “in vitro” do acibenzolar-S-metil (ASM) sobre microrganismos

Pascholati et al. (1998) avaliaram o efeito do ASM na germinação de conídios, formação de apressório e crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola*. Para o crescimento micelial, o experimento foi conduzido em placas de Petri com meio batata dextrose-ágar (BDA) e foram utilizadas as

seguintes concentrações do ASM: 0, 1, 10, 100 e 200 ppm. Foi observada redução no crescimento micelial na presença de 100 e 200 ppm do produto. Além disso, sobre suspensões de conídios, o produto foi adicionado em várias concentrações entre 0,1 e 200 ppm. O experimento foi conduzido em lâminas de vidro recobertas com poliestireno e foi observado que, à medida que a concentração do produto aumentava, havia uma redução na germinação e na formação de apressórios fúngicos. Dessa maneira, foi evidenciado o efeito fungistático deste produto na germinação de conídios, formação de apressórios e crescimento micelial de *C. graminicola*.

Resende et al. (2000) avaliaram o efeito do ASM na germinação de esporos e crescimento micelial de *Crinipellis pernicioso*. Foram testadas concentrações que variaram de 15,63 a 1000 ppm para ambos os ensaios. A porcentagem de inibição da germinação de esporos foi avaliada em lâminas escavadas e a inibição do crescimento micelial foi avaliada medindo-se o crescimento das colônias em placas de Petri. Os valores estimados a partir de regressão linear permitiram classificar o ASM como sendo de pouca ação tóxica, segundo a classificação de toxidez para fungos (Edgington et al., 1971).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1997. 635p.

BION: o ativador de plantas. São Paulo: Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., 21p. 2001. (Boletim técnico)

CONTI, G. G.; PIANEZZOLA, A.; ARNOLDI, A.; VIOLINI, G.; MAFFI, D. Possible involvement of salicylic acid in systemic acquired resistance of *Cucumis sativus* against *Sphaerotheca fuliginea*. **European Journal of Plant Pathology**, The Netherlands, v. 102, p. 537-544, 1996.

COOPER, R. M. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 418, 2001.

DELANEY, T. P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 1, p. 5-12, 1997.

EDEN BIOSCIENCE. **Messenger®**, Bothell, Washington, 2000, 4p. (Technical bulletin)

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n.1, p. 42-44, 1971.

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

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMAN, H.; RYALS, J. Requeriment of salycilic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, Madison, v. 261, n. 5122, p. 745-756, Aug. 1993.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KANAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, Apr. 1996.

HANN, M. G. Microbial elicitors and their receptor in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 387-412, 1996.

INBAR, M.; DOOSTAR, H.; SONODA, R. M.; LEIBEE, G. L.; MAYER, T. Elicitors of plant defensive system reduce insect densities and disease incidence. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, n. 1, p. 135-149, 1998.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-459, 1994.

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

LOON, L. C. van; ANTONIW, J. F. Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. **Netherland Journal Plant Pathology**, The Netherlands, v. 88, p. 237-256, 1982.

LOON, L. C. van; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in the integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 636-641, 1997.

MOFFAT, A. S. Plant Pathology – news. In: **Science**, Madison, v. 292, n. 22, p. 2270-2273, 2001.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. ; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (eds.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Embrapa, 1998. v. 6, p. 261-284.

NOVARTIS CROP PROTECTION. **The plant activator. nature created the concept.** Basle, Switzerland: Novartis, 1997. 35 p.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, Piracicaba: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-453.

PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; HOTO, F. V.; PICCININ, E.; OSSWALD, W. Efeito *in vitro* do ativador de defesa vegetal “Bion” no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 23, p. 266, 1998. (Suplemento)

PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S.; CASTRO, R. M.; STADINIK, M.; LEITE, B. Conclusões do grupo de discussão: bioquímica fitopatológica e indução de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 24, p. 241, 1999. (Suplemento)

RASMUSSEN, J. B.; HAMMERSCHIMIDT, R.; ZOOK, M. N. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 4, p. 1342-1347, 1991.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; AGUILAR, M. A. G.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (ASM). **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.

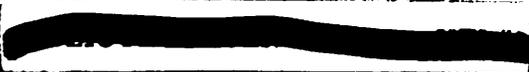
ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, Minas Gerais: UFV, 1999. 45p. (Cadernos didáticos)

ROMEIRO, R. S. PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 177-184, 2000.

RUESS, W.; MUELLE, K.; KNAUF-BEITER, G.; KUNZ, W.; STAUB, T. **Plant activator CGA 245704**: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. Switzerland: Ciba-Geigy Ltd, 1997, p. 9-18.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

RYALS, J. A.; UKNES, S.; WARD, F. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 4, p. 1109-1112, 1994.



SILVA, L. H. C. P., RESENDE, M. L. V.; MARTINS JÚNIOR, H.; CAMPOS, J. R.; SOUZA, R. M.; CASTRO, R. M. Épocas e modo de aplicação do ativador de plantas benzothiadiazole (ASM) na proteção contra a mancha bacteriana em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 375-377, 2000. (Suplemento)

STADNICK, M. J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action.** Stuttgart: Verlag Ulrich E. Grauer, 1999. 140p.

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

CAPÍTULO 2

**Efeito comparativo do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na
proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Oidium lycopersici*
e *Septoria lycopersici***

1 RESUMO

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Efeito comparativo do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. In: Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. Lavras: UFLA, 2002. p. 23-42. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

O acibenzolar-S-metil (ASM) teve seu efeito como indutor de resistência avaliado contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici*, em tomateiro. Entre os tratamentos utilizados, aquele que continha o ASM (2,5 g i.a./100 L água) induziu proteção de até 77,78% e 44,62%, em relação à testemunha, contra *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *O. lycopersici*, respectivamente. Entretanto, quando avaliado contra *S. lycopersici*, a proteção máxima foi de apenas 8,02%. Embora pertença a uma classe diferente (indutor de resistência), o ASM teve sua eficácia avaliada comparativamente com mancozeb (240 g i.a./100 L de água), oxiclreto de cobre (110 g i.a./100 L de água) e oxitetraciclina (100 g i.a./100 L de água). O ASM foi aplicado em duas doses diferentes, 1,25 e 2,5 g i.a./100 L de água e em mistura com mancozeb e oxiclreto de cobre. Para *X. campestris* pv. *vesicatoria*, os tratamentos que continham ASM destacaram-se como os mais eficazes. Para *O. lycopersici*, ASM + mancozeb destacou-se como o melhor tratamento. Já para *S. lycopersici*, os melhores tratamentos foram aqueles que continham mancozeb. Ao se avaliar esse complexo de doenças, o ASM em mistura com o mancozeb proporcionou maior redução na severidade dessas.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Comparative effect of the resistance inducer acibenzolar-S-methyl on protection against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Oidium lycopersici* and *Septoria lycopersici* on tomato. In: Systemic resistance triggered by acibenzolar-S-methyl against diseases on tomato. Lavras: UFLA, 2002. p. 23-42. (Dissertation Master Program in Phytopathology)*

Acibenzolar-S-methyl (ASM) had its effect assessed as a resistance inducer against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Oidium lycopersici*, *Septoria lycopersici*, on tomato. Against *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *O. lycopersici*, those treatments containing ASM (2.5 g i.a./100 L of water), induced protection of 77.78% and 44.62% compared to the control, respectively. However, when assessed against *S. lycopersici*, the maximum protection obtained was 8.02% compared to the control. Although belonging to a different class (resistance inducer), the ASM had its efficacy comparatively assessed with mancozeb (240 g a.i./100 L of water), copper oxichloride (110 g a.i./100 L of water) and oxitetracycline (100 g a.i./100 L of water). ASM was applied at two different doses, 1.25 g i.a./100L of water and 2.5 g i.a./100L of water and in mixture with mancozeb and copper oxichloride. The best treatments were ASM at any dosage, ASM plus mancozeb and all treatments containing mancozeb to protect against *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *O. lycopersici* and *S. lycopersici*, respectively. ASM mixture with mancozeb provided the greatest reduction on severity of all those diseases as a whole.

Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) requer intensivos tratos culturais, desde a implantação até a colheita. Esse sistema intensivo de cultivo é responsável, muitas vezes, pela ocorrência e disseminação de pragas e doenças. Várias são as doenças que comprometem a produção e comercialização do tomate. Entre elas, podemos citar as doenças fúngicas e bacterianas, embora aquelas causadas por vírus e nematóides sejam também de grande importância. A septoriose, cujo agente etiológico é *Septoria lycopersici*, pode provocar perdas consideráveis na produção do tomateiro tanto pela destruição da folhagem quanto pela exposição dos frutos à queimadura de sol (Lopes & Santos, 1994). *Oidium lycopersici*, agente etiológico da enfermidade conhecida como oídio, tem sido encontrado esporadicamente no campo e, portanto, não é tão problemático sob tais condições, embora sob cultivo protegido, possa assumir grande importância econômica. A mancha bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* reduz a produtividade pela destruição de tecido foliar e pela derrubada de frutos em formação. Além disso, compromete a qualidade e o valor comercial dos frutos para o comércio (Lopes & Santos, 1994).

Os métodos utilizados no controle de doenças, tanto fúngicas quanto bacterianas, muitas vezes não têm sido eficientes, principalmente em se tratando de controle químico. Devido aos problemas de fitotoxidez, impacto ambiental e surgimento de populações resistentes de patógenos, os antibióticos vêm sendo cada vez menos utilizados (Lopes, 2000). Fungicidas protetores à base de cobre, amplamente utilizados num passado recente, vêm perdendo cada vez mais espaço para os fungicidas sistêmicos, os quais já representam mais de 50% do mercado. Com a diminuição da utilização dos cúpricos, doenças bacterianas

tornaram-se mais freqüentes, ocasionando maiores perdas. Assim sendo, o produtor vem buscando alternativas que, quando utilizadas dentro de uma filosofia de manejo integrado, promovem mais efetivamente o controle de doenças.

Devido ao seu sistema de vida sedentário, as plantas, com suas extensas estruturas aéreas e subterrâneas, são alvo perfeito para ataque de microrganismos patogênicos e pragas (Moraes, 1998). Entretanto, há um consenso de que a regra é a resistência e, portanto, a ocorrência da doença, é exceção. Tal fato é explicado pela especificidade das interações patógeno-hospedeiro e, além disso, as plantas possuem diferentes barreiras estruturais ou bioquímicas para impedir a entrada e posterior colonização do patógeno. Em ambos os casos, estas barreiras podem ser pré-formadas (constitutivas) e/ou pós-formadas (induzíveis) (Agrios, 1997). As barreiras pré-formadas são aquelas presentes na planta antes do ataque de patógenos, enquanto que as pós-formadas são aquelas que estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidas ou ativadas em resposta à presença do patógeno, como no caso da resistência sistêmica adquirida (SAR).

Entre as substâncias que podem induzir SAR, o ácido salicílico (AS) e outras substâncias como, por exemplo, o ASM [sulfo-metil-éster do ácido benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbotióico] e o ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) destacam-se como algumas das mais importantes. Entretanto, tanto o AS quanto o INA, ainda não possuem potencial para uso comercial, pois são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas.

O ASM pertence ao grupo químico benzotiadiazole (Venâncio et al., 2000) e é, até o momento, o único indutor de SAR liberado para o uso comercial no Brasil.

Após a aplicação de ASM nas plantas, o mesmo é rapidamente absorvido e translocado por toda a planta, gerando um sinal sistêmico que

desencadeia a expressão de genes de defesa (Agrawal et al., 1999), após ter proporcionado alterações na atividade de sinalizadores envolvidos nos processos anti-estresses. Vale salientar que o processo conhecido como doença, nada mais é que um estresse biológico.

É no âmbito da questão que a resistência induzida pelo acibenzolar-S-metil mostra-se como uma promissora ferramenta adicional no manejo integrado de doenças do tomateiro.

Assim sendo, o presente capítulo teve por objetivo avaliar a eficácia do acibenzolar-S-metil e outros produtos fitossanitários para a proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de mudas

Plantas de tomateiro da cultivar Jumbo foram formadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato Plantmax®. As mudas foram transplantadas trinta dias após a semeadura para sacos de polietileno com volume de 2 L, contendo terra, esterco bovino e areia na proporção de 2:2:1, respectivamente, sendo mantidas em casa de vegetação ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) até o término dos experimentos. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, em quatro repetições de cinco plantas cada.

4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* foi isolada de tecidos de tomateiro apresentando sintomas característicos da doença, em meio 523 de Kado e Heskett (1970), pela técnica de estrias paralelas. Para garantir o sucesso da inoculação artificial, as plantas foram mantidas sob condições de alta umidade relativa (aproximadamente 100%) durante 24 horas antes e após a inoculação. A suspensão bacteriana foi pulverizada aos 33 dias após o transplantio, principalmente na superfície abaxial da folha, na concentração aproximada de 10^8 ufc/mL, calibrada com o auxílio de espectrofotômetro, $A_{540}=0,03$ (Oliveira, 1995). Os primeiros sintomas foram observados nove dias após a inoculação.

O fungo *Oidium lycopersici* não foi inoculado, tendo esse ocorrido naturalmente, provavelmente favorecido pela ausência de irrigação na parte aérea das plantas. Sua ocorrência foi constatada aos quarenta dias após o transplantio e, portanto, não interferiu na avaliação visual dos sintomas de *X.*

campestris pv. *vesicatoria*. Além do mais, os sintomas causados por tal patógeno são característicos, o que facilitou a avaliação destes.

Septoria lycopersici também não foi inoculado. Sua presença foi constatada 35 dias após o transplantio, principalmente nas folhas mais velhas. As folhas que apresentaram sintomas de septoriose foram avaliadas somente para esse patógeno.

4.3 Montagem do ensaio e avaliação

Foram utilizados como tratamentos: testemunha inoculada; ASM (1,25 g i.a./100 L de água); ASM (2,5 g i.a./100 L de água); ASM + mancozeb (240 g i.a./100 L); ASM + oxicloreto de cobre (110 g i.a./100 L); mancozeb (240 g i.a./100 L) + oxicloreto de cobre (110 g i.a./100 L); oxitetraciclina (100 g i.a./100 L). Nos tratamentos onde o ASM foi aplicado em mistura, a concentração utilizada foi de 2,5 g i.a./100 L de água.

Foram realizadas três aplicações dos produtos aos 30, 37 e 44 dias após o transplantio, sendo a primeira aplicação aos três dias antes da inoculação da bactéria.

As avaliações foram realizadas aos dois e quinze dias após a última aplicação dos produtos para mancha bacteriana e oídio e aos cinco e quinze dias após a primeira aplicação dos produtos para a septoriose. Seguiu-se a escala de notas de Sidhu & Webster (1977) (Tabela 1), sendo todas as folhas de cada planta avaliadas. Após cada avaliação, foi calculado o índice de doença (ID), em que:

$$ID = \Sigma \text{ das notas de cada planta} / n^{\circ} \text{ de folhas avaliadas.}$$

TABELA 1 – Escala de avaliação adaptada para severidade de doenças foliares em tomateiro.

Nota	Severidade (%)*	Índice de doença
0	0	0
1	de 1 a 25	de 0,04 a 1,00
2	de 26 a 50	de 1,04 a 2,00
3	de 51 a 75	de 2,04 a 3,00
4	acima de 76	de 3,04 a 4,00

* Porcentagem de área foliar lesionada.

Para todos os agentes etiológicos foi avaliada a severidade da doença e, para *O. lycopersici*, a incidência também foi avaliada.

As diferenças estatísticas foram estimadas pela análise de variância a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), sendo utilizado o teste de Tukey para a comparação de médias. A ANAVA, bem como o sorteio para casualização das parcelas, foi realizada com auxílio do programa Sisvar, versão 4.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o controle de *X. campestris* pv. *vesicatoria* todos os tratamentos que apresentavam o ASM isoladamente ou em mistura proporcionaram reduções significativas no índice de doença (Tabela 2), tanto na primeira quanto na segunda avaliação.

TABELA 2 – Índice de doença (ID) e severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro cultivar Jumbo, em casa de vegetação, aos dois e quinze dias após a última aplicação dos produtos.

Tratamento	2 dias			15 dias		
	ID	Severidade (%)		ID	Severidade (%)	
Testemunha	0,982	24,55	B*	1,237	30,92	C*
ASM (1,25 g i.a./100 L)	0,152	3,80	A	0,604	15,10	AB
ASM (2,5 g i.a./100 L)	0,204	5,10	A	0,275	6,87	A
ASM + mancozeb	0,253	6,30	A	0,404	10,10	AB
ASM + cobre	0,441	11,02	A	0,882	22,05	B C
Mancozeb + cobre	1,032	25,80	B	1,007	25,17	C
Oxitetraciclina	0,905	22,62	B	0,880	22,00	B C
C.V. (%)	23,19			27,08		

* Dados são médias de vinte repetições e médias seguidas pela mesma letra nas colunas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A severidade da doença nas plantas tratadas com ASM foi reduzida, em média, 56,27% em relação às plantas testemunhas. Reduções significativas na severidade da mancha bacteriana do tomateiro em plantas tratadas com ASM também foram observadas por Inbar et al. (1998). Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2000) quando avaliaram o efeito de épocas e modo de aplicação do ASM na proteção contra essa doença. Embora o ASM tenha promovido reduções significativas na severidade da mancha bacteriana, tal produto não teve efeito direto sobre *X. campestris* pv. *vesicatoria* na concentração de 1000 ppm (Kobayashi et al., 2001), o que implica em modo de ação divergente dos demais produtos utilizados no controle da mancha bacteriana do tomateiro, os quais apresentam toxidez direta a essa bactéria.

Experimentos com acibenzolar-S-metil, visando ao controle da mancha bacteriana do tomateiro, foram realizados por Louws et al. (2001) nos Estados Unidos e Canadá, durante o período de 1996 a 1999. Além da testemunha inoculada e do tratamento com ASM, foi adicionado um tratamento padrão com fungicidas protetores (hidróxido de cobre + ditiocarbamato), exceto nos ensaios realizados no Canadá. Foram utilizadas as seguintes cultivares: Agriset 761, Rutgers, Solar Set, Sun Leaper, OH 7814, Peto 692, Sunbeam e Heinz 9478. A proteção conferida pelo ASM em relação à testemunha variou de 36,3% na cultivar Sunbeam a 67,95% na Heinz 9478.

No caso de cultivares de tomateiro para processamento industrial, segundo Silva et al. (2001b), a proteção média proporcionada pelo ASM foi de 58,64%, variando entre 52,93% para Hypeel 108 e 64,18% para Heinz 9665.

A variação na proteção conforme a cultivar avaliada, infere que a resistência induzida pelo ASM é dependente de genótipo, ou seja, o produto pode conferir maior ou menor proteção em determinadas cultivares.

Para a proteção contra *O. lycopersici*, aqueles tratamentos que continham mancozeb destacaram-se como os melhores na redução da severidade da doença (Tabela 3).

TABELA 3 – Índice de doença (ID) e severidade (%) do oídio em plantas de tomateiro cultivar Jumbo, em casa de vegetação, aos dois e quinze dias após a última aplicação dos produtos.

Tratamentos	2 dias*			15 dias		
	ID	Severidade (%)		ID	Severidade (%)	
Testemunha	0,385	9,62	B**	1,221	30,52	BC**
ASM (1,25 g i.a./100 L)	0,000	0,00	A	1,283	32,07	BC
ASM (2,5 g i.a./100 L)	0,010	0,25	A	0,676	16,90	AB
ASM + mancozeb	0,000	0,00	A	0,168	4,20	A
ASM + cobre	0,061	1,52	A	1,520	38,00	D
Mancozeb + cobre	0,005	0,12	A	0,374	9,35	A
Oxitetraciclina	0,297	7,42	B	1,607	40,17	D
C.V. (%)		52,35			27,94	

* Dados transformados em $X^{0,5}$ (apenas para a avaliação aos dois dias).

** Dados são médias de vinte repetições e médias seguidas pela mesma letra nas colunas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para a avaliação da incidência do oídio aos dois dias após a última aplicação dos produtos, as plantas tratadas com ASM para ambas as dosagens ou em mistura com mancozeb, tiveram a incidência da doença reduzida em relação ao tratamento testemunha na ordem de, em média, 91,07% (Figura 1).

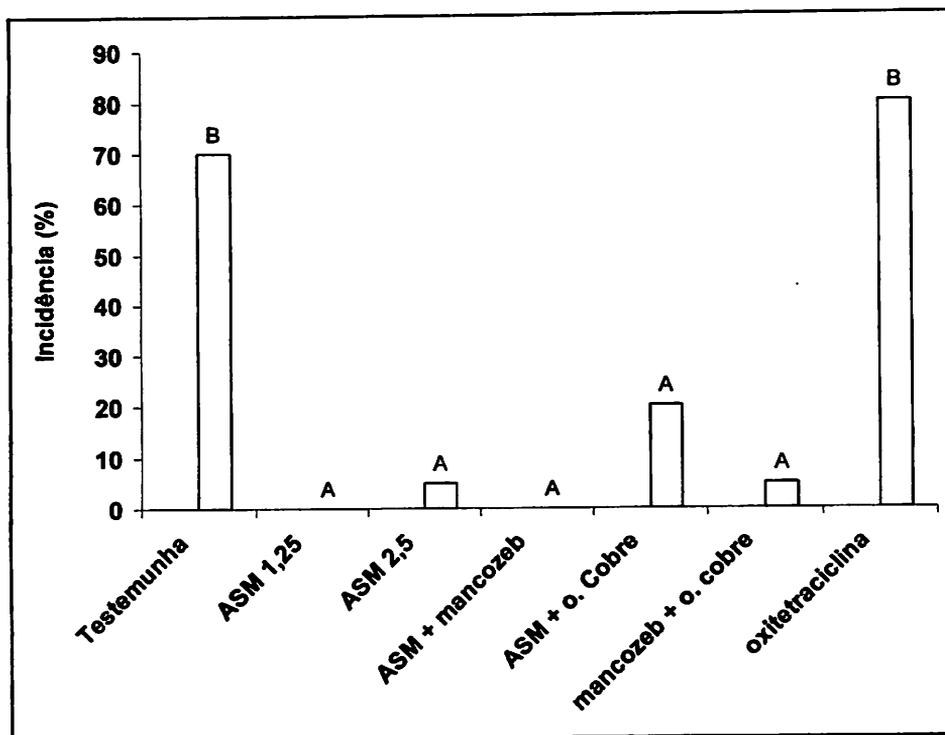


FIGURA 1 – Incidência de oídio em plantas de tomateiro cultivar Jumbo, em casa de vegetação, aos dois dias após a última aplicação dos produtos.

Entretanto, aos quinze dias após a última aplicação dos produtos, foi observada incidência em quase todas as plantas. É importante salientar que esta avaliação foi realizada treze dias após a primeira, o que implica na necessidade

de reativação dos mecanismos de defesa contra oídio num período de tempo inferior a treze dias. Não foram utilizados produtos específicos para oídio.

Para o controle de *S. lycopersici*, o melhor tratamento foi aquele pulverizado com mancozeb + oxiclreto de cobre, seguido pelo mancozeb em mistura com ASM. A severidade da doença foi reduzida em 64,48% e 52,62%, respectivamente, em relação a testemunha. (Tabela 4).

TABELA 4 – Índice de doença (ID) e severidade da septoriose (%) em plantas de tomateiro cultivar Jumbo, em casa de vegetação, aos cinco e quinze dias após a primeira aplicação dos produtos.

Tratamentos	5 dias			15 dias		
	ID	Severidade		ID	Severidade	
Testemunha	1,181	29,52	D*	1,157	28,92	C*
ASM (1,25 g i.a./100 L)	0,792	19,80	BCD	0,880	22,00	ABC
ASM (2,5 g i.a./100 L)	1,093	27,32	D	1,064	26,60	BC
ASM + mancozeb	0,420	10,50	AB	0,548	13,70	AB
ASM + cobre	1,056	26,40	CD	1,086	27,17	C
Mancozeb + cobre	0,255	06,37	A	0,411	10,27	A
Oxitetraciclina	0,582	14,55	ABC	0,925	23,12	ABC
C.V. (%)	26,43			24,72		

* Dados são médias de vinte repetições e médias seguidas pela mesma letra nas colunas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Ao se avaliar a planta como um todo, para todos os sintomas simultaneamente, somando-se toda redução de área foliar devido a cloroses e necroses, o melhor tratamento foi aquele onde o ASM foi aplicado em mistura com o mancozeb (Tabela 5).

TABELA 5 – Índice de doença (ID) e severidade (%) do complexo de doenças em tomateiro cultivar Jumbo, em casa de vegetação, aos dois e quinze dias após a última aplicação dos produtos.

Tratamentos	2 dias			15 dias		
	ID	Severidade		ID	Severidade	
Testemunha	2,548	63,69	D*	3,615	90,36	E*
ASM (1,25 g i.a./100 L)	0,944	23,60	AB	2,767	69,17	CD
ASM (2,5 g i.a./100 L)	1,306	32,67	BC	2,015	50,37	BC
ASM + mancozeb	0,673	16,80	A	1,120	28,00	A
ASM + cobre	1,558	38,94	BC	3,488	87,22	DE
Mancozeb + cobre	1,291	32,29	BC	1,792	44,79	B
Oxitetraciclina	1,784	44,59	C	3,412	85,29	DE
C.V. (%)	17,85			11,76		

* Dados são médias de vinte repetições e médias seguidas pela mesma letra nas colunas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A resistência induzida pelo ASM em tomateiro possui certamente amplo espectro de proteção. Fidantsef et al. (1999) comprovaram que o ASM proporcionou também reduções significativas na severidade da pinta bacteriana do tomateiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Estudos realizados por Anfoka (2000), comprovaram a eficácia do produto na redução da incidência e severidade do *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) em tomateiro. Em trabalhos conduzidos por Silva et al. (2001a), visando à proteção contra *Ralstonia solanacearum*, agente etiológico da murcha bacteriana do tomateiro, o ASM promoveu reduções significativas na incidência e severidade da doença independente do modo de aplicação do produto. Plantas tratadas com ASM via pulverização foliar apresentaram 100% de redução na incidência desta bacteriose. Já quando o produto foi aplicado no solo, essa redução caiu para 70,08%, sendo que as plantas testemunha apresentaram incidência superior a 62%.

Assim, o ASM surge como um promissor indutor de resistência. Entretanto, deve ser encarado como uma ferramenta adicional no manejo integrado de doenças em tomateiro. Por ser de amplo espectro e inespecífica, embora parcial, a resistência induzida pelo ASM poderá contribuir para o controle de diferentes doenças do tomateiro, desde que seja integrada com outras táticas de controle.

6 CONCLUSÕES

- 1 – O acibenzolar-S-metil, utilizado isoladamente ou em mistura, reduziu significativamente a severidade da mancha bacteriana do tomateiro.**
- 2 – A severidade da septoriose do tomateiro não foi reduzida significativamente pelo acibenzolar-S-metil quando aplicado isoladamente.**
- 3 – A incidência e severidade de oídio do tomateiro foram reduzidas significativamente pela aplicação preventiva do acibenzolar-S-metil.**
- 4 – O acibenzolar-S-metil deverá ser aplicado em intervalos inferiores a treze dias para a proteção contra oídio do tomateiro.**
- 5 – O melhor tratamento para o controle deste complexo de doenças em tomateiro foi aquele em que o acibenzolar-S-metil foi aplicado em mistura com o mancozeb.**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. **Induced plant defenses against pathogens and herbivores, biochemistry, ecology and, agriculture.** St Paul, Minnesota: APS Press, 1999. 390p.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology.** 4. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1997. 635p.

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**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 401-405, July, 2000.

FIDANTSEF, A. L.; STOUT, M. J.; THALER, J. S.; DUFFEY, S. S.; BOSTOCK, R. M. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, p. 97-114, 1999.

INBAR, M.; DOOSTAR, H.; SONODA, R. M.; LEIBEE, G. L.; MAYER, T. Elicitors of plant defensive system reduce insect densities and disease incidence. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, n. 1, p. 135-149, 1998.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for the isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-979, 1970.

KOBAYASTI, L.; SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L. V.; CASTRO, R. M. Efeito “in vitro” do indutor de resistência acibenzolar-S-metil sobre bactérias patogênicas ao tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Forlâteza, v. 26, p. 293-294, 2001. (Suplemento)

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 61p.

LOPES, C. A. Bacterioses de hortaliças: situação atual e perspectivas de controle. In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Manejo integrado de doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000. p. 187-208.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n.5, p. 481-488, May, 2001.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. ; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (eds.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Embrapa, 1998. v. 6, p. 261-284.

OLIVEIRA, J. R. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro**. 1995. 98p. Tese. (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 117-127, 1977.

SILVA, L. H. C. P., RESENDE, M. L. V.; MARTINS JÚNIOR, H.; CAMPOS, J. R.; SOUZA, R. M.; CASTRO, R. M. Épocas e modo de aplicação do ativador de plantas benzothiadiazole (ASM) na proteção contra a mancha bacteriana em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 375-377, 2000. (Suplemento)

SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L. V. e CASTRO, R. M. Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26, p. 295-295, 2001a. Suplemento.

SILVA, L. H. C. P.; MARTINS, H.; CAMPOS, J. R.; MORAES, S. R.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CASTRO, R. M. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) contra *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria em cinco genótipos de tomateiro industrial. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 119, 2001b.

VENANCIO, W. S., ZAGONEL, J., FURTADO, E. D., SOUZA, N. L.; PERES, N. A. R. Novos Fungicidas II – Famoxadone e indutores de resistência. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M., PRESTES, A. M., PICININI, E. C. (eds.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Embrapa, 2000. v. 8, p. 59-92.

CAPÍTULO 3

**Época, modo de aplicação e doses de manutenção do acibenzolar-S-metil
contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiro**

1 RESUMO

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Época, modo de aplicação e dose de manutenção do acibenzolar-S-metil contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiro. In: Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. Lavras: UFLA, 2002. p. 43-59 (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

O acibenzolar-S-metil (ASM) teve seu efeito avaliado como indutor de resistência contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, agente etiológico da mancha bacteriana em tomateiro. Foram avaliadas quatro épocas de aplicação do produto (14, 7, 3 e 1 dia antes da inoculação) em dois modos de aplicação (pulverização foliar e irrigado no solo) em tomateiro da cultivar Jumbo, no esquema fatorial com quatro repetições e cinco plantas por repetição. O ASM, para todas as épocas e modos de aplicação, foi aplicado na concentração de 2,5 g i.a./100 L de água, sendo utilizado um volume de 25 mL da suspensão por planta. O ASM induziu uma redução na severidade da doença que variou de 40% a 70% em relação à testemunha não tratada. As melhores épocas de aplicação foram três e um dia antes da inoculação, não sendo detectada diferença significativa no modo de aplicação do produto. Em outro experimento, em que foram realizadas três aplicações do ASM em doses de manutenção (100, 50 e 25% da dose original) com intervalo de aplicação de sete dias, não houve diferença significativa na proteção conferida em relação a testemunha não tratada.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Timing, mode of application and doses of maintenance of acibenzolar-S-methyl against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato. In: Systemic resistance triggered by acibenzolar-S-methyl against diseases on tomato. Lavras: UFLA, 2002. p. 43-59. (Dissertation Master Program in Phytopathology)*

Acibenzolar-S-methyl (ASM) had its effect assessed as a inducer of resistance against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, agent of bacterial spot of tomato. Four application times (14, 7, 3 or 1 day before inoculation) and two ways of application (foliar spraying or soil drenching) were assessed on fresh market tomatoes cultivar Jumbo, in a factorial scheme, with four replications of five plants each. For both ways of applications, ASM was applied at 2.5 g a.i./100 L of water, using 25 mL of the suspension/plant. ASM induced reductions in disease severity ranging from 40% to 70% in relation to the control (untreated plants). The best application times were one and three days before inoculation and no significant differences were detected between modes of application. Another experiment was conducted using ASM in three applications at maintenance doses (100, 50 and 25% of original dose) every seven days with a protection of 51.52% compared to untreated plants.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O tomateiro, pertencente à família das solanáceas, gênero *Lycopersicon*, caracteriza-se pela grande suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças, sendo *Lycopersicon esculentum* Mill, a espécie cultivada comercialmente.

Entre as várias doenças, aquelas causadas por bactérias merecem especial atenção. Bactérias fitopatogênicas constituem-se em importantes patógenos de plantas, não só pelos prejuízos que causam, mas também pela facilidade com que se disseminam e pela dificuldade em se controlar as enfermidades por elas incitadas. A mancha bacteriana, cujo agente etiológico é *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, reduz a produtividade pela destruição do tecido foliar e pela derrubada de frutos em formação. Além disso, compromete a qualidade e o valor comercial dos frutos (Lopes & Santos, 1994).

Os métodos utilizados para o controle de doenças bacterianas muitas vezes não têm sido eficientes, principalmente em se tratando de controle químico. Fungicidas cúpricos, que anteriormente eram amplamente utilizados para o controle de fungos, também auxiliavam no controle de bacterioses, entretanto, com o advento dos fungicidas sistêmicos, os fungicidas cúpricos vêm sendo cada vez menos utilizados. Por outro lado, por serem aplicados, principalmente de forma preventiva, os fungicidas cúpricos estão mais sujeitos a intempéries climáticas, o que reduz consideravelmente a eficácia destes. Além disso, o aparecimento de populações de bactérias resistentes aos cúpricos, tem contribuído para a redução da sua utilização (Lopes, 2000).

Os antibióticos não são tão eficientes e persistentes como os fungicidas e, por isso, requerem maior frequência de aplicações. Outro fator limitante de uso é a fitotoxicidez destes produtos, principalmente quando utilizados no tratamento de sementes (Lopes, 2000). Devido ao uso indevido e indiscriminado dos antibióticos na agricultura, têm surgido muitas populações de bactérias

resistentes aos mesmos (Lopes, 2000), o que limita ainda mais sua possibilidade de uso dentro de uma estratégia de manejo integrado. Com a necessidade crescente de aumentar a produção com o mínimo impacto ambiental, novas táticas de controle vêm sendo buscadas a cada dia.

É sabido que as plantas podem defender-se do ataque de patógenos por meio de barreiras estruturais ou bioquímicas. Em ambos os casos, estas barreiras podem ser pré-formadas (constitutivas) e/ou pós-formadas (induzidas) (Agrios, 1997). As barreiras pré-formadas são aquelas presentes na planta antes do ataque de patógenos, enquanto que as pós-formadas são aquelas que estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidas ou ativadas em resposta à presença do patógeno, como no caso de resistência sistêmica adquirida (SAR).

O acibenzolar-S-metil (ASM), recentemente registrado no Brasil, está entre aquelas substâncias capazes de induzir resistência sistêmica em plantas contra o ataque de patógenos.

Assim sendo, o presente trabalho objetivou determinar a melhor época e modo de aplicação do ASM para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, bem como avaliar a possibilidade de redução na dose utilizada nas reativações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de mudas

Sementes de tomateiro foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato Plantmax®. Trinta dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno com volume de 2 L, contendo terra, esterco bovino e areia na proporção 2:2:1, respectivamente. O solo foi corrigido e adubado conforme necessário. As plantas permaneceram em casa de vegetação ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) até o término dos experimentos.

O fungicida difenoconazole e os inseticidas lufenuron, abamectin, cyromazine e thiametoxan foram utilizados, quando necessário, para controle de demais enfermidades e pragas ocorridas durante os ensaios, sendo esses aplicados em todos os tratamentos.

4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* foi isolada de folhas infectadas de tomateiro em meio 523 de Kado & Heskett (1970) pela técnica das estrias paralelas e cultivada neste mesmo meio antes de se proceder às inoculações.

Para as inoculações, foram utilizadas colônias com cerca de 36 horas de cultivo. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada, com o auxílio do espectrofotômetro, para $A_{540}=0,03$, o que corresponde aproximadamente a 10^8 ufc/mL (Oliveira, 1995). A inoculação foi realizada via pulverização foliar, sendo que as plantas permaneceram em câmara úmida durante 24 horas antes e após a inoculação.

4.3 Escala de avaliação utilizada nos experimentos

Para todos os ensaios foi utilizada uma adaptação da escala de avaliação de Sidhu & Webster (1977), a qual é baseada em um critério de notas que variam de 0 a 4, conforme a severidade da doença (Tabela 1).

TABELA 1 – Escala de avaliação adaptada para severidade da mancha bacteriana em tomateiro.

Nota	Severidade (%)	Índice de doença
0	0	0
1	de 1 a 25	de 0,04 a 1,00
2	de 26 a 50	de 1,04 a 2,00
3	de 51 a 75	de 2,04 a 3,00
4	acima de 76	de 3,04 a 4,00

Foi calculado o índice de doença (ID), por planta, sendo:

$$ID = \Sigma \text{ das notas das folhas} / n^{\circ} \text{ de folhas avaliadas (em cada planta).}$$

4.4 Montagem dos ensaios e avaliações

4.4.1 Experimento 1: Efeito de épocas e modo de aplicação do ASM na severidade da mancha bacteriana

Mudas da cultivar Jumbo, tutoradas em bambu e conduzidas no sistema de haste única, foram pulverizadas ou irrigadas via solo com suspensão de ASM

na concentração de 2,5 g i.a./100 L de água, sendo aplicados 25 mL da suspensão/planta. O ASM foi aplicado aos quatorze, sete, três ou um dia antes da inoculação, em uma única aplicação, aos 26, 33, 37 e 39 dias após o transplântio, respectivamente. Foi também incluído um tratamento testemunha, no qual as plantas foram inoculadas sem serem pulverizadas ou irrigadas com a suspensão de ASM.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) no delineamento experimental de blocos casualizados, no esquema fatorial (épocas X modo de aplicação) com quatro repetições e cinco plantas por repetição.

A inoculação foi realizada aos quarenta dias após o transplântio e as avaliações foram aos quatorze e vinte dias após a inoculação, conforme descrito anteriormente, em que todas as folhas de todas as plantas foram avaliadas.

4.4.2 Experimento 2: Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha bacteriana

Plantas da cultivar Jumbo foram plantadas e transplântas conforme descrito anteriormente, sendo conduzidas em sistema de haste única e tutoradas em bambu. Testemunha inoculada e plantas tratadas com ASM nas concentrações de 2,5, 1,25 e 0,625 g i.a./100 L de água, foram os tratamentos utilizados. Entretanto, a primeira aplicação do ASM foi realizada aos cinco dias após o transplântio, na dosagem de 2,5 g i.a./100 L de água para todos os tratamentos, exceto a testemunha. Para as segunda e terceira aplicações, foram utilizadas as concentrações de manutenção supracitadas aos dezoito e 26 dias após o transplântio, respectivamente.

Esse ensaio foi conduzido em casa de vegetação ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), no delineamento experimental de blocos casualizados em quatro repetições com cinco plantas por repetição.

A inoculação foi realizada aos treze dias após o transplante e as avaliações foram realizadas aos sete, quatorze e dezoito dias após a inoculação, conforme descrito anteriormente, onde todas as folhas de todas as plantas foram avaliadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: Efeito de épocas e modo de aplicação do ASM na severidade da mancha bacteriana

Como não houve interação significativa entre o modo e as épocas de aplicação do ASM, foi realizada a análise individual dos fatores.

5.1.1 Época de aplicação do ASM

O ASM quando aplicado uma única vez, um ou três dias antes da inoculação, promoveu redução significativa na severidade da doença de até 70% em relação à testemunha (Tabela 2), sendo que na testemunha a severidade da doença foi cerca de 34%. Quando aplicado uma única vez, sete ou quatorze dias antes da inoculação, a proteção induzida pelo ASM caiu praticamente à metade.

Anfoka (2000), em estudos visando o controle de virose em tomateiro cultivar Vollendung, comprovou que uma única aplicação do ASM aos sete dias antes da inoculação do patógeno desafiador, CMV, foi suficiente para promover significativas reduções na incidência e severidade da doença.

Já Fidantsef et al. (1999), visando ao controle de doenças em tomateiro, comprovaram que o ASM promoveu reduções significativas na severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) em relação à testemunha, quando aplicado seis dias antes da inoculação do desafiador.

Em trabalhos conduzidos por Resende et al. (2000), o ASM induziu maior proteção contra *Crinipellis pernicioso* em mudas de cacaueteiro, quando aplicado aos trinta dias antes da inoculação. Esse resultado demonstra que a época de aplicação é bastante variável conforme a espécie cultivada e o patógeno em questão.

Para proteção de tomateiro em casa de vegetação contra esta bactéria , sugere-se que a primeira aplicação do ASM seja realizada quinze dias após o transplântio e que reaplicações do produto sejam realizadas em intervalos de inferiores a quatorze dias.

TABELA 2- Efeito de modo e épocas de aplicação do ASM na redução da severidade (%) da mancha bacteriana em tomateiro, aos quatorze e vinte dias após a inoculação.

Modo de aplicação	Época de aplicação	14 dias	20 dias
Test. inoculada *	-	0,00	D 0,00 C
	14 d.a.i.**	36,57*** C	29,83 B
	7 d.a.i	48,41 BC	38,49 B
Pulverização foliar	3 d.a.i	64,13 AB	66,09 A
	1 d.a.i	66,96 AB	67,72 A
	14 d.a.i	33,21 C	35,06 B
Irrigado no solo	7 d.a.i	38,75 C	35,56 B
	3 d.a.i	72,50 A	62,03 A
	1 d.a.i	67,58 AB	70,93 A
C.V.(%)		17,79	13,58

Dados são médias de vinte repetições e médias seguidas por mesma letra na coluna são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

* Testemunha considerada como 100% de severidade

** Dias antes da inoculação.

*** Porcentagem de controle em relação à testemunha inoculada.

5.1.2 Modo de aplicação do ASM

Não houve diferença significativa entre o modo de aplicação do produto. Por ter se mostrado capaz de ativar os mecanismos de defesa da planta, mesmo quando irrigado no solo, o ASM certamente poderá também ser aplicado via água de irrigação, o que poderia implicar na redução do custo de produção.

A possibilidade de aplicação do ASM irrigado no solo também foi comprovada por Anfoka (2000) para o controle do *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) em tomateiro.

5.2 Experimento 2: Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha bacteriana

A ativação dos mecanismos de resistência é temporária e, por isso, torna-se necessário promover a reativação destes mecanismos em determinados intervalos de tempo.

Doses de manutenção do produto aplicado não diferiram significativamente entre si (Tabela 3). Para a reativação dos mecanismos de defesa da planta, a dose utilizada do produto poderá ser reduzida em até quatro vezes. Entretanto, quando são realizadas pelo menos duas aplicações, como demonstrado nesse ensaio, o intervalo de aplicação do produto para a reativação dos mecanismos de defesa da planta pode ser estendido para, no mínimo, sete dias.

A severidade da doença nas plantas testemunha foi, em média, 37,73%, sendo que esta severidade foi reduzida em 54,70%, 44,75% e 58,82% quando o ASM foi aplicado em doses de manutenção nas concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625 g i.a./100 L de água, respectivamente, em casa de vegetação.

TABELA 3- Efeito de doses de manutenção do ASM na redução da severidade (%) da mancha bacteriana em tomateiro aos sete, quatorze e dezenove dias após a inoculação.

Tratamentos	7dias	14 dias	19 dias	Média	
Test. Inoculada*	0,00	0,00	0,00	0,00	B
Dose original	57,97**	52,17	53,85	54,66	A
50% da dose original	42,75	41,07	39,43	41,08	A
25% da dose original	70,28	55,77	50,43	58,82	A
C.V.(%)	12,91	6,44	5,90	-	

Dados são médias de vinte repetições e médias seguidas pela mesma letra na coluna são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Dados transformados em $X^{0,5}$.

* Testemunha considerada com 100% de severidade

** Porcentagem de controle em relação à testemunha inoculada.

Ensaio conduzidos no ano agrícola de 1998, sob condições de campo nas regiões de São José do Rio Pardo e Guaira, São Paulo, comprovaram que quando se reduzia a dose de aplicação do ASM de 2,5 para 1,25 g i.a./100 L de água, mesmo após oito aplicações em intervalos de sete dias, havia uma redução significativa na proteção de plantas de tomate contra *P. syringae* pv. *tomato* (Castro et al., 1998/1999). É importante salientar que o resultado obtido neste ensaio foi sob condições controladas, diferindo portanto das condições de campo onde ocorre a interação com diversos fatores ambientais. Assim, testes em

campo deverão ser realizados para comprovação da efetividade das reduções das doses de manutenção.

6 CONCLUSÕES

1 – O modo de aplicação do acibenzolar-S-metil, em casa de vegetação, não influenciou na proteção conferida contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

2 – O acibenzolar-S-metil deverá ser aplicado quinze dias após o transplântio e reaplicado em intervalos inferiores a quatorze dias para a proteção contra *X. campestris* pv. *vesicatoria* em casa de vegetação.

3 – A dose de manutenção do acibenzolar-S-metil pode ser reduzida em até 75% após a primeira aplicação na dose original (2,5g i.a./100L de água), em condições de casa de vegetação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1997. 635p.
- 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**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 401-405, July, 2000.
- CASTRO, R. M.; AIZAWA, J.; GARCIA, L. D. Protection on tomatoes against bacterial speck and tomato canker after cga 245.704 application. **Novartis Biocience in house tests proceedings**, São Paulo, 8p., 1998/1999.
- FIDANTSEF, A. L.; STOUT, M. J.; THALER, J. S.; DUFFEY, S. S.; BOSTOCK, R. M. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, p. 97-114, 1999.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for the isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-979, 1970.
- LOPES, C. A. Bacterioses de hortaliças: situação atual e perspectivas de controle. In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Manejo integrado de doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000. p. 187-208.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 61p.

OLIVEIRA, J. R. **Deteção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro**. 1995. 98p. Tese. (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; AGUILAR, M. A. G.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. **Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotriazolone (ASM)**. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. **The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex**. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 117-127, 1977.

CAPÍTULO 4

**Resistência induzida pelo acibenzolar-S-metil em cinco genótipos de
tomateiro, para processamento industrial, contra *Xanthomonas campestris*
pv. *vesicatoria***

1 RESUMO

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Resistência induzida pelo acibenzolar-S-metil em cinco genótipos de tomateiro para processamento industrial contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. Lavras: UFLA, 2002. p. 60-73 (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

A resistência induzida envolve a ativação de genes de defesa, os quais podem estar presentes ou não numa mesma espécie de planta, conforme a cultivar. Portanto, objetivou-se, neste capítulo, avaliar a eficácia do ASM na proteção de cinco cultivares de tomateiro para processamento industrial contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Foram utilizadas as seguintes cultivares: Hypeel 108, Heinz 9665, RTP 1570, RTP 1095 e AP 529. A proteção conferida pelo ASM foi efetiva para os cinco genótipos avaliados, promovendo redução na severidade da doença de até 64,18% em relação às respectivas testemunhas. Assim, a ação do ASM como um indutor de resistência mostra-se bastante promissora em tomateiro contra a mancha bacteriana.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Induced resistance by acibenzolar-S-methyl on five genotypes of processing tomatoes against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Systemic resistance triggered by acibenzolar-S-methyl against diseases on tomato. Lavras: UFLA, 2002. p. 60-73. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Induced resistance involves activation of defense genes, which can be present or not in the same species of plant, depending on cultivar. Thus, this work was aimed at assessing the ASM efficacy on five tomato genotypes against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. The following cultivars were assessed: Hypeel 108, Heinz 9965, RTP 1570, RTP 1095 and AP 529. The protection conferred by ASM was effective for all processing tomato genotypes, inducing an average disease severity reduction of 64.18% in relation to the respective controls. Therefore, ASM acts as a resistance inducer against bacterial spot, irrespective of the tomato genotype assessed.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Lycopersicon* apresenta grande variabilidade, o que vem permitindo o desenvolvimento de cultivares para atender às mais diversas demandas do mercado, tanto para o tomate para processamento industrial quanto para consumo “in natura” (Giordano & Ribeiro, 2000). O tomate para processamento industrial é produzido em vários países, mas os Estados Unidos destacam-se como o principal produtor mundial. O Brasil também merece destaque entre os principais produtores. A produção no ano de 1999 foi superior a 1,3 milhão de toneladas, com área cultivada superior a 20 mil hectares. Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Ceará e Pernambuco são os estados brasileiros responsáveis pela maior parte da produção nacional (Silva & Giordano, 2000).

Em semelhança ao tomate para consumo “in natura”, o tomate para processamento industrial também é muito suscetível ao ataque de doenças. Devido ao seu porte baixo e ao plantio em espaçamentos reduzidos, a incidência de doenças bacterianas é favorecida pelo microclima formado entre as plantas.

Mais de cem doenças já foram relatadas atacando tomateiro, provocando diferentes níveis de redução na produtividade ou na qualidade do produto comercial (Lopes et al., 2000). As doenças causadas por bactérias fitopatogênicas vêm se tornando cada vez mais importantes, seja pela facilidade com que se disseminam, seja pela dificuldade de seu controle.

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* tem se mostrado como um dos principais problemas fitossanitários nesse cultivo, causando significativas reduções na produtividade. Além disso, os métodos de controle conhecidos para a mancha bacteriana não têm sido efetivos, principalmente em se tratando do controle químico, o que agrava a situação (Lopes, 2000).

A resistência induzida pelo acibenzolar-S-metil (ASM) tem se mostrado uma ferramenta promissora no manejo da mancha bacteriana em tomate para consumo “in natura”.

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a eficácia do ASM na proteção de diferentes genótipos de tomateiro industrial contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de mudas

Sementes de tomateiro de diferentes cultivares, escolhidas em conformidade com sua ampla utilização no campo, foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato Plantmax®. Trinta dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno contendo terra, esterco bovino e areia na proporção 2:2:1, respectivamente. O solo foi corrigido e adubado conforme necessário. As plantas permaneceram em casa de vegetação ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), até o término dos experimentos.

O fungicida difenoconazole e os inseticidas lufenuron, abamectin, cyromazine e thiametoxan foram utilizados, quando necessário, para controle de demais enfermidades e pragas ocorridas durante os ensaios. Os produtos foram aplicados em todos os tratamentos.

4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* foi isolada de folhas infectadas de tomateiro em meio 523 de Kado & Heskett (1970) pela técnica das estrias paralelas e cultivada neste mesmo meio antes de se proceder as inoculações.

Para as inoculações, foram utilizadas colônias com cerca de 36 horas de cultivo. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada, com o auxílio do espectrofotômetro, para $A_{540}=0,03$, o que corresponde aproximadamente a 10^8 ufc/mL (Oliveira, 1995). A inoculação foi realizada via pulverização foliar, sendo que as plantas permaneceram em câmara úmida durante 24 horas antes e após a inoculação.

4.3 Escala de avaliação usada no experimento

Foi utilizada a escala de avaliação de Sidhu & Webster (1977), que se baseia em um critério de notas variando de 0 a 4, conforme a severidade da doença (Tabela 1).

TABELA 1 – Escala de avaliação adaptada para severidade da mancha bacteriana em tomateiro.

Nota	Severidade (%)	Índice de doença
0	0	0
1	de 1 a 25	de 0,04 a 1,00
2	de 26 a 50	de 1,04 a 2,00
3	de 51 a 75	de 2,04 a 3,00
4	acima de 76	de 3,04 a 4,00

Foi calculado o índice de doença (ID), por planta, sendo:

$$ID = \Sigma \text{ das notas das folhas} / n^{\circ} \text{ de folhas avaliadas (em cada planta).}$$

4.4 Montagem do ensaio e avaliação

Plantas das cultivares Heinz 9665, RTP 1095, RTP 1570, AP 529 e Hypeel 108 foram formadas e transplantadas conforme descrito anteriormente. As plantas permaneceram em casa de vegetação ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), no delineamento experimental de blocos casualizados com quatro repetições e cinco plantas por repetição.

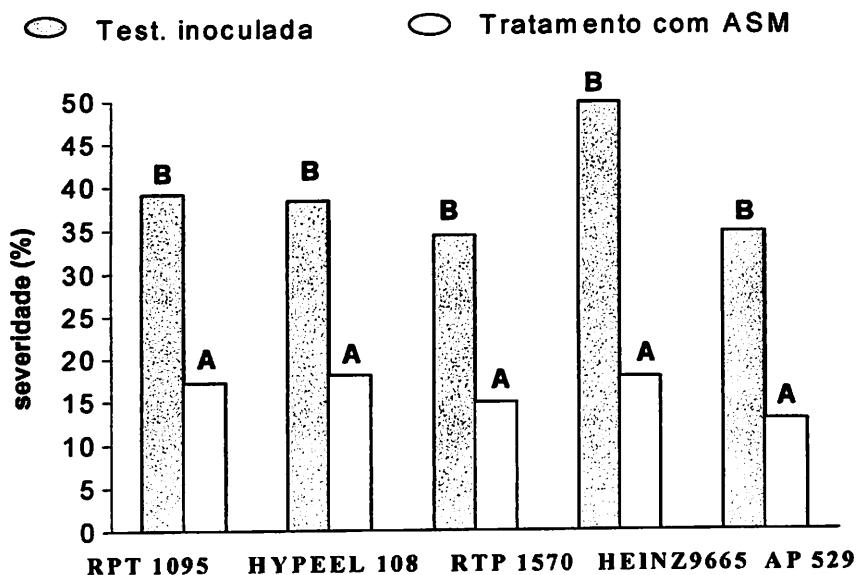
Foram realizadas três pulverizações da suspensão de ASM aos quinze, 22 e 29 dias após o transplantio, na concentração de 2,5 g i.a./100 L de água, sendo que essa suspensão foi aplicada logo após ser preparada.

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* foi inoculada aos 32 dias após o transplantio. Foi realizada uma única avaliação da severidade da doença aos nove dias após a inoculação, seguindo-se a escala descrita anteriormente, em que todas as folhas foram avaliadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resistência, quando induzida por elicitores bióticos ou abióticos, é dependente do genótipo do hospedeiro, ou seja, pode ser efetiva em algumas cultivares e não em outras de uma mesma espécie.

Nesse ensaio, para todas as cultivares de tomate para processamento industrial utilizadas, a resistência induzida pelo ASM foi bastante efetiva, promovendo reduções, em média, de 58,64% na severidade da doença em relação à testemunha (Figura 1).



Dados são médias de vinte repetições e barras seguidas pela mesma letra são iguais estatisticamente.

FIGURA 1 – Severidade da mancha bacteriana em cinco genótipos de tomate para processamento industrial.

Na cultivar Heinz 9665 ocorreu a maior redução na severidade da doença, ou seja, 64,18% (Tabela 2, Figura 2) quando tratada com o ASM em relação à testemunha não tratada. Esta apresentou 49,9% de severidade da doença. A proteção conferida pelo ASM não diferiu entre cultivares.

A resistência induzida pelo acibenzolar-S-metil mostra-se promissora para o controle da enfermidade incitada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, tanto em tomate estaqueado quanto em tomate rasteiro. Entretanto, deve ser encarada como uma ferramenta adicional ao manejo integrado, principalmente por induzir resistência parcial.

TABELA 2 – Severidade da mancha bacteriana e porcentagem de proteção promovida pelo ASM em cinco genótipos de tomateiro industrial.

Tratamento	severidade (%)		% de proteção
RTP 1095 (ASM)	17,13	A	56,20 A
RTP 1095 (testemunha)	39,11	B	
RTP 1570 (ASM)	14,85	A	56,79 A
RTP 15 70 (testemunha)	37,34	B	
Hypeel 108 (ASM)	18,07	A	52,93 A
Hypell 108 (testemunha)	38,39	B	
AP 529 (ASM)	12,83	A	63,10 A
AP 529 (testemunha)	34,77	B	
Heinz 9665 (ASM)	17,87	A	64,18 A
Heinz 9665 (testemunha)	49,90	B	
C.V. (%)	15,38		

Dados são médias de vinte repetições e médias seguidas pela mesma letra em cada coluna são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Experimentos com acibenzolar-S-metil, visando ao controle da mancha bacteriana do tomateiro, foram realizados por Louws et al. (2001) nos Estados Unidos e Canadá, durante o período de 1996 a 1999. Além da testemunha inoculada e do tratamento com ASM, foi adicionado um tratamento padrão com fungicidas protetores (hidróxido de cobre + ditiocarbamato), exceto nos ensaios realizados no Canadá. Foram utilizadas as seguintes cultivares: Agriset 761, Rutgers, Solar Set, Sun Leaper, OH 7814, Peto 692, Sunbeam e Heinz 9478. A proteção conferida pelo ASM em relação à testemunha variou de 36,3% na cultivar Sunbeam a 67,95% na Heinz 9478. Isso indica que o ASM pode conferir maior ou menor proteção contra a mancha bacteriana conforme a cultivar estudada.

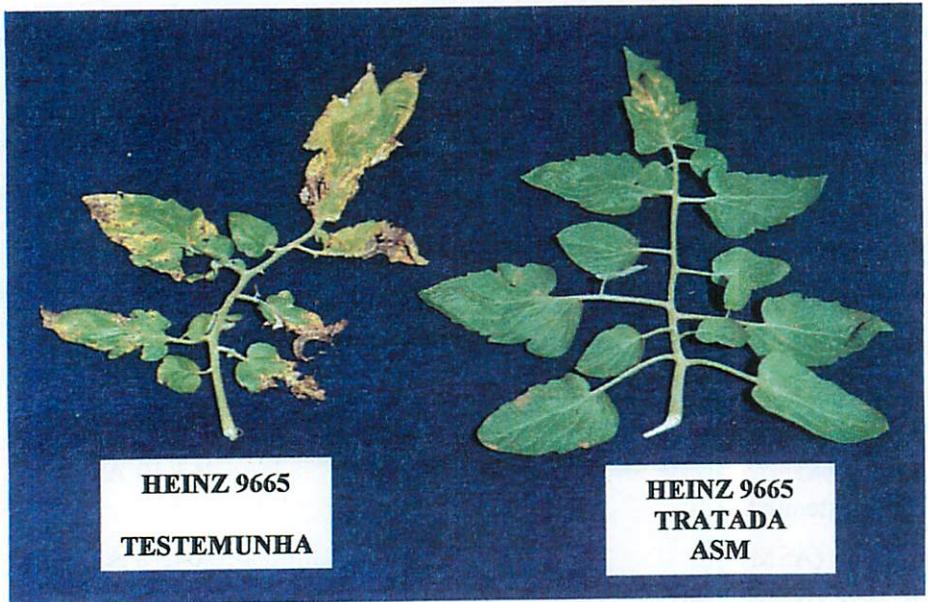


FIGURA 2 – Sintomas da mancha bacteriana em plantas (cultivar Heinz 9665) tratadas e não tratadas com ASM.

6 CONCLUSÃO

- 1 – O ASM foi efetivo na proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em todas as cultivares avaliadas de tomateiro para processamento industrial, em condições de casa de vegetação, conferindo proteção média de 58,64%.
- 2 – As cultivares estudadas apresentaram o mesmo padrão de suscetibilidade a mancha bacteriana do tomateiro, em condições de casa de vegetação.
- 3 – O grau de resistência induzida pelo ASM não variou significativamente entre as cultivares avaliadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GIORDANO, L. B.; RIBEIRO, C. S. C. Origem, botânica e composição química do fruto. In: *Tomate para processamento industrial*. In: SILVA, J. B. C; GIORDANO, L. B. (org.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, 2000. p. 12-17.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for the isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-979, 1970.

LOPES, C. A. Bacterioses de hortaliças: situação atual e perspectivas de controle. In: ZAMBOLIM, L. (ed.) **Manejo integrado de doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000. p. 187-208.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R.; ÁVILA, C. A.; BEZERRA, I. C.; CHARCHAR, J. M.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças: identificação e controle. In: SILVA, J.B.C; GIORDANO, L.B. (org.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, 2000. p.88-111.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, St. Paul, v. 85, n.5, p. 481-488, May, 2001.

OLIVEIRA, J. R. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro.** 1995. 98p. Tese. (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 117-127, 1977.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. Produção mundial e nacional. In: SILVA, J. B. C; GIORDANO, L. B. (org.). **Tomate para processamento industrial.** Brasília: Embrapa, 2000. p. 8-11.

CAPÍTULO 5

**Mecanismos de ação do acibenzolar-S-metil em tomateiro contra
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria***

1 RESUMO

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Mecanismos de ação do acibenzolar-S-metil em tomateiro contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. Lavras: UFLA, 2002. p. 74-87 (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

O acibenzolar-S-metil (ASM) teve seu efeito avaliado “in vitro” sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, nas seguintes concentrações do produto 0, 10, 50, 100 e 1000 ppm. Para efeito de comparação, foi utilizado um tratamento com sulfato de estreptomicina, nas mesmas concentrações. A avaliação foi realizada medindo-se o halo de inibição do crescimento bacteriano promovido pelos produtos. O ASM não apresentou atividade direta sobre essa bactéria até a concentração de 1000 ppm. A atividade de peroxidase foi avaliada em plantas de tomate da cultivar Santa Clara tratadas ou não com ASM. Foram coletadas amostras às 12 horas, um, três, sete e onze dias após a aplicação do ASM. Aumento significativo na atividade dessa enzima foi observado em plantas tratadas com ASM a partir de 12 horas até onze dias após o tratamento. O pico de atividade da peroxidase foi 24 horas após o tratamento. Isso indica que a lignificação está possivelmente envolvida entre as repostas de defesa do tomateiro contra essa bactéria.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador) e Ricardo Magela de Souza – UFLA.

2 ABSTRACT

SILVA, Luís Henrique Carregal Pereira da. Mechanisms of action of acibenzolar-S-methyl in tomato against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Systemic resistance triggered by acibenzolar-S-methyl against diseases on tomato. Lavras: UFLA, 2002. p. 74-87. (Dissertation-Master Program in Phytopathology)*

Acibenzolar-S-methyl (ASM) had its effect assessed “in vitro” against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* at the following concentrations: 0, 10, 50, 100 e 1000 ppm. Treatments with streptomycin sulphate at the same concentrations were used as standard antibiotic treatments. The inhibition halo of bacterial growth was assessed. ASM had no direct toxic effect against this bacterium up to 1000 ppm. Peroxidase activity was assessed on tomatoes cv. Santa Clara treated or not with ASM. Samples of leaves were collected 12 hours, one, three, seven and eleven days after ASM application. Significant increases on peroxidase activities were observed in plants treated with ASM, from 12 hours up to eleven days, peaking at 24 hours after treatment. It is suggested that lignification is possibly involved in the tomato defense response against that bacteria.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor) and Ricardo Magela de Souza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Vários são os possíveis mecanismos envolvidos na resistência induzida, os quais, podem ser divididos em estruturais e bioquímicos.

Entre os mecanismos de defesa ativados, podem ser citados o acúmulo de fitoalexinas, quitinases e β -1,3 glucanases (PRP's) (Loon & Antoniwi, 1982), o aumento de peroxidases (correlacionado com o aumento de lignificação) e a formação de halos e papilas.

Tem sido verificado que plantas de trigo tratadas com ASM, por exemplo, apresentaram maior atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e peroxidases após a inoculação com *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Stadnik, 1999). A fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima chave para a síntese de fenilpropanóides e a peroxidase é a última enzima regulatória para a síntese de lignina. Plantas de trigo tratadas com ASM impedem a penetração de *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* pela formação eficiente de papilas (Stadnik, 2000).

Por outro lado, no patossistema sorgo – *Colletotrichum graminicola*, em estudos conduzidos na ESALQ/USP, foi demonstrado que há uma indução na produção de fitoalexinas diretamente proporcional ao aumento da dose de ASM até o limite de 50 ppm. Ainda foram verificadas as enzimas glucanases e quitinases que, inesperadamente, apresentaram redução na atividade (Pascholati et al., 1999).

Em estudos realizados na UFPA, por Resende et al. (2000), foi observada uma correlação positiva entre indução de resistência e atividade de peroxidases em cacau. Foram avaliados os níveis de fenóis totais, polifenoloxidasas e peroxidases aos três, quinze e trinta dias após a aplicação do ASM em plantas de cacau da cultivar Catongo, objetivando explicar seu mecanismo de ação. Foi observado que não houve diferença significativa no conteúdo de fenóis totais e na atividade de polifenoloxidasas. Entretanto,

ocorreu um aumento significativo na atividade de peroxidases para todos os períodos avaliados, sugerindo possível envolvimento do ASM na síntese de lignina.

Assim sendo, os mecanismos de atuação do ASM podem variar dependendo do patossistema avaliado (Pascholati et al., 1999).

A exploração dos mecanismos de SAR possibilita uma alternativa ao uso de fungicidas para o controle de doenças de plantas, com o emprego de produtos ativadores de SAR. Entretanto, observações sugerem que efeitos colaterais do agente indutor possam, sob certas circunstâncias, afetar negativamente a fisiologia da planta e/ou que a indução de resistência tenha um custo energético para a planta (Pascholati et al., 1999).

Em trabalhos conduzidos por Silva et al. (2001) (dados não publicados) foi observado que tomateiros estaqueados tratados com ASM não apresentaram efeitos colaterais referentes à filotaxia e altura das plantas, quando comparados às plantas não tratadas. Entretanto, foi observada deficiência de nitrogênio nas plantas tratadas com ASM. Essa deficiência, provavelmente, é devida ao desvio do nitrogênio no metabolismo secundário para a síntese de composto de defesa, tais como proteínas relacionadas à patogênese e enzimas envolvidas na rota de produção de fitoalexinas.

Objetivou-se, nesse capítulo, avaliar alguns mecanismos de defesa ativados pelo ASM, bem como a possibilidade de toxidez direta do produto “in vitro” à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de mudas

Sementes de tomateiro cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato Plantmax®. Trinta dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno contendo terra, esterco bovino e areia na proporção 2:2:1, respectivamente. O solo foi corrigido e adubado conforme necessário. As plantas permaneceram em casa de vegetação ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) até o término dos experimentos.

4.2 Obtenção do patógeno desafiador e inoculação

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* foi obtida de tecidos de tomateiro que apresentavam sintomas característicos da doença. Essa bactéria foi isolada em meio 523 de Kado & Heskett (1970) pela técnica de estrias paralelas. Para garantir o sucesso da inoculação artificial, as plantas foram mantidas sob condições de alta umidade relativa (aproximadamente 100%) durante 24 horas antes e após a inoculação. A suspensão bacteriana foi pulverizada aos 33 dias após o transplantio, na superfície abaxial da folha na concentração aproximada de 10^8 ufc/mL, calibrada com o auxílio de espectrofotômetro, $A_{540}=0,03$ (Oliveira, 1995).

4.3 Experimento 1: Efeito “in vitro” do ASM sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

O ASM teve seu efeito “in vitro” avaliado sobre *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Foram utilizadas as concentrações de 0, 10, 50, 100 e 1000 ppm do produto. Sulfato de estreptomicina foi utilizado como um tratamento adicional, nas mesmas concentrações supracitadas, para aferição da técnica. Em placas de

Petri contendo o meio 523 de Kado & Heskett e a respectiva bactéria (igualmente distribuída por toda placa), foram adicionados dois discos de papel de filtro (dez mm de diâmetro) equidistantes, anteriormente embebidos na suspensão do produto. É importante salientar que, em uma mesma placa, havia os dois produtos na mesma concentração. Após a adição dos disquinhos, as placas foram colocadas em geladeira a 4°C durante uma hora e, posteriormente, incubadas por 48 h a 28°C, sendo, então, realizada a avaliação pela da medida dos halos de inibição promovidos pelos produtos.

4.4 Experimento 2: Atividade de peroxidase em plantas tratadas ou não com ASM

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com três repetições e com oito plantas cada. Das oito plantas de cada parcela, três foram utilizadas para coletar amostras para avaliação da atividade enzimática e cinco para se avaliar o efeito do ASM na proteção contra *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Foram realizadas duas aplicações do ASM (2,5g i.a./ 100L água) aos sete e quatorze dias após o transplantio e a inoculação com o desafiador (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) três dias após a primeira aplicação do produto, na concentração de 10^8 ufc/mL. As amostras de tecidos jovens foram coletadas às 12h e 24h, três, sete e onze dias após a primeira aplicação do ASM.

As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos treze e 28 dias após a segunda aplicação do produto, sendo utilizada a escala de Sidhu & Webster (já descrita anteriormente no item 4.3).

Coleta do material vegetal

O material vegetal coletado constou da parte apical das plantas de tomateiro. As folhas foram lavadas em água destilada e secas em papel toalha. Posteriormente, as folhas foram colocadas dentro de um béquer, ao qual foi adicionado nitrogênio líquido. Após esse congelamento rápido, as plantas foram

embrulhadas em papel alumínio e colocadas dentro de um isopor com gelo. Quando as amostras não foram processadas imediatamente após a coleta, as mesmas foram mantidas em ultra-freezer a -80°C .

Processamento das amostras

1) Extração

Primeiramente, 0,2 g da amostra foi macerado na presença de N_2 líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, foram adicionados 10 mL de tampão fosfato de potássio (TFP) a 0,1M e pH 6,8, resultando em uma amostra líquida. Tal amostra foi coada com auxílio de gaze e vertida para um microtubo de centrifuga (Eppendorf®).

2) Preparo da amostra

Os frascos eppendorfs contendo as amostras foram centrifugadas a 4°C , 14.000 rpm durante quinze minutos. Cada sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e o sedimento descartado. Como as amostras não foram imediatamente utilizadas, elas foram armazenadas em ultra-freezer.

3) Atividade enzimática

O substrato utilizado para avaliar a atividade de peroxidase foi o guaiacol 1%.

2,6 mL TFP 0,05M;

0,1 mL peróxido de hidrogênio;

0,1 mL da amostra;

0,3 mL de guaiacol.

4) Espectrofotômetro

O espectrofotômetro foi calibrado para os comprimentos de onda 420 e 470 nm. As leituras foram realizadas a cada cinco segundos durante, pelo menos, dois minutos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito “in vitro” do ASM sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Para que um determinado produto possa ser classificado como um indutor de resistência, é necessário que alguns requisitos sejam atendidos. Entre eles, o de não apresentar atividade tóxica direta sobre o microrganismos estudado.

O ASM não apresentou atividade direta sobre *X. campestris* pv. *vesicatoria* até a concentração de 1000 ppm. É importante salientar que a concentração utilizada para o tratamento da planta “in vivo” é quarenta vezes menor que a maior concentração utilizada “in vitro” nesse experimento. Assim, pode-se inferir que o modo de ação do ASM é divergente dos demais produtos utilizados para o controle dessa bacteriose, não sendo bactericida. Friedrich et al. (1996) avaliaram o efeito “in vitro” do ASM em dezoito diferentes patógenos, não sendo observada toxidez direta a nenhum deles para concentrações de até 295 ppm.

Resende et al. (2000), ao avaliarem o efeito do ASM na germinação de esporos e crescimento micelial de *Crinipellis pernicioso*, em concentrações que variaram de 15,63 a 1000 ppm, observaram que os valores estimados a partir de regressão linear permitiram classificar o ASM como sendo de pouca ação tóxica, segundo a classificação de toxidez para fungos (Edgington et al., 1971).

5.2 Atividade de peroxidase em plantas tratadas ou não com ASM

Aumento significativo na atividade de peroxidase foi observado em plantas tratadas com ASM, a partir de doze horas da aplicação do produto, sendo que essa enzima teve seu pico de atividade 24 horas após o tratamento. Para o

tratamento ASM + bactéria, foi observado um pico da atividade dessa enzima aos sete dias após o tratamento, devido à presença da bactéria. No tratamento em que a bactéria foi inoculada e não houve o tratamento com ASM, observou-se um aumento do pico de atividade da peroxidase aos onze dias. Tal fato é possivelmente devido à severidade da doença, tendo muitas lesões necróticas sido constatadas. A peroxidase é uma enzima responsável pela transformação de álcoois monolignóis em lignina. Quanto maior for a presença de lesões necróticas, provavelmente maior será a presença de lignina, como resposta da planta ao ataque de patógenos (Figura 1).

A severidade da mancha bacteriana foi reduzida significativamente em plantas tratadas com ASM em relação à testemunha (Tabela 1).

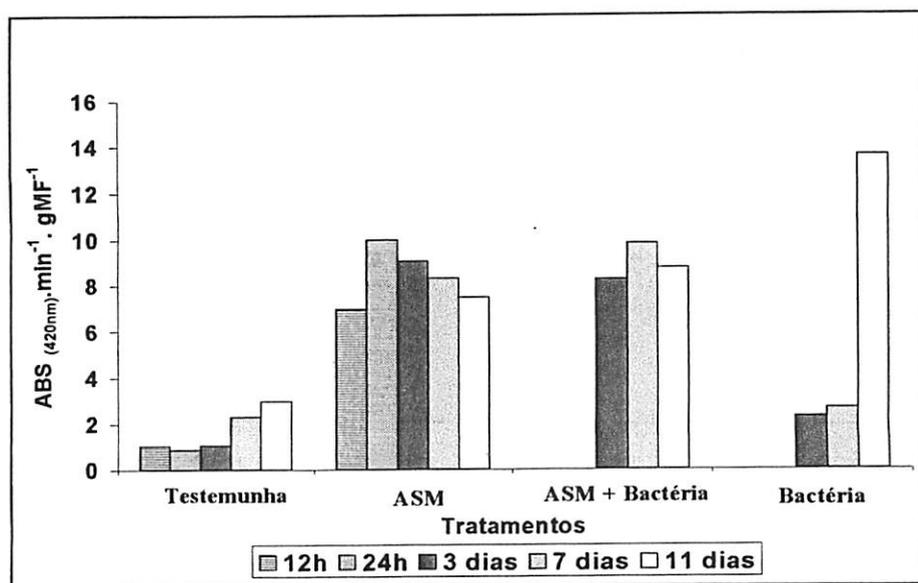


FIGURA 1 – Atividade de peroxidase em plantas de tomateiro tratadas ou não com ASM.

TABELA 1 – Índice de doença e severidade de mancha bacteriana aos treze e 28 dias após a segunda aplicação do ASM.

Tratamentos	13 dias		28 dias	
	ID*	Severidade (%)	ID	Severidade (%)
Testemunha	1,7128	42,82 B	1,6677	41,69 B
ASM	0,8190	20,47 A	0,8280	20,70 A
CV (%)	15,76		19,35	

* ID – Índice de doença.

Dados são médias de quinze repetições e médias seguidas pela mesma letra nas colunas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

- 1 – O acibenzolar-S-metil não apresenta atividade direta sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* até a concentração de 1000 ppm.
- 2 – Plantas tratadas com ASM apresentaram aumento na atividade de peroxidase doze horas após a aplicação do produto, sendo que o pico na atividade foi no primeiro dia após a aplicação.
- 3 – A redução na severidade da mancha bacteriana está possivelmente relacionada com o aumento da lignificação em plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

LOON, L. C. van; ANTONIW, J. F. Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. **Netherland Journal Plant Pathology**, The Netherlands, v. 88, p. 237-256, 1982.

OLIVEIRA, J.R. *Detecção de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria em sementes de tomateiro*. Viçosa: UFV, 1995. 98p. (Tese de Doutorado)

PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S.; CASTRO, R.M.; STADINIK, M.; LEITE, B. Conclusões do grupo de discussão: bioquímica fitopatológica e indução de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 24, p. 241, 1999. Suplemento.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; SILVA, L.H.C.P.; AGUILAR, M.A.G.; NIELLA, G.R.; CARVALHO, G.A.; GIOVANINI, G.R.; CASTRO, R.M. perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis perniciosa* através do benzotiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 117-127, 1977.

STADNICK, M. J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action.** Stuttgart: Verlag Ulrich E. Grauer, 1999. 140p.

STADNICK, M. J. **Indução de resistência a oídios.** **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal. v. 26, n. 1, p. 175-177, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) poderá ser utilizado como uma ferramenta adicional ao manejo de doenças em tomateiro em casa-de-vegetação.

Em todos os experimentos realizados para a proteção contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foram observadas reduções significativas na severidade da doença superiores a 50% em relação à testemunha. O ASM estaria induzindo a ativação dos mecanismos de defesa da planta ou o produto teria efeito tóxico direto sobre essa bactéria? Para que um produto seja classificado como indutor de resistência, este não pode apresentar atividade tóxica direta ao patógeno e o ASM não apresentou atividade tóxica direta sobre essa bactéria em concentrações até 1000 ppm (concentração 40 vezes maior que a dose recomendada). Além disso, aumentos significativos na atividade de peroxidase foram observados em plantas tratadas com ASM. A atividade desta enzima está relacionada com a lignificação dos tecidos da planta. Provavelmente, ocorreu maior lignificação dos tecidos ao redor dos estômatos, os quais são as principais portas de entrada para essa bactéria. Assim sendo, a bactéria conseguiria penetrar no tecido hospedeiro, via estômatos, mas, contudo, teria maior dificuldade para colonizar tecidos próximos ao local de infecção.

Para a proteção contra o complexo de doenças do tomateiro (mancha bacteriana, oídio e septoriose), o melhor tratamento na redução da severidade das doenças foi aquele em que o ASM foi aplicado em mistura com o mancozeb. Provavelmente, ocorreu um sinergismo entre o ASM e o mancozeb, uma vez que o mancozeb apresenta manganês e zinco em sua constituição que, por sua vez, podem ser cofatores de enzimas envolvidas no processo da resistência induzida. É importante salientar que *X. campestris* pv. *vasicatoria* foi inoculada e que *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* foram oriundos de infecção natural. A

infecção natural desses patógenos foi bem uniforme entre os tratamentos, provavelmente devido ao sistema de ventilação da casa de vegetação (fluxo e refluxo de ar) que distribuiu uniformemente o inóculo.

Foram realizadas avaliações para cada patógeno separadamente e, também, para o complexo da doença, no qual a severidade de cada doença foi somada, tendo-se uma noção geral do estado fitossanitário das plantas.

Para a avaliação da septoriose, inesperadamente, o tratamento com oxitetraciclina apresentou algum efeito sobre a severidade da septoriose do tomateiro. Provavelmente, a incidência e/ou severidade de uma determinada doença tenha sido influenciada pela incidência e/ou severidade de outra.

Na indução de resistência em tomate para processamento industrial, foram utilizadas as cultivares híbridas que mais estavam sendo plantadas na época do experimento. Tomou-se o cuidado de escolher cultivares de diferentes empresas, a saber: Asgrow (AP 529); Heinz (Heinz 9665); Petoseed (Hypeel 108); Rogers (RTP 1570 e RTP 1095). Todas as cultivares apresentaram o mesmo padrão de suscetibilidade e o grau de proteção conferida pelo ASM não diferiu significativamente.

De maneira geral, para quase todos experimentos em casa-de-vegetação, foi observado que plantas tratadas com ASM apresentavam maior amarelecimento das folhas mais velhas. Provavelmente, tal fato seja devido à deficiência nutricional de nitrogênio, uma vez que este nutriente pode ter sido desviado do metabolismo primário da planta para produção de compostos de defesa no metabolismo secundário. Entretanto, análises foliares não foram realizadas com o intuito de se avaliar este nutriente.