

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Verticillium dahliae* Kleb.
EM PLÂNTULAS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)
CV. THEOBAHIA, POR BENZOTIADIAZOLE (BTH)**

LEONARDO SOUSA CAVALCANTI

2000

50033

MFN 35134

LEONARDO SOUSA CAVALC

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Verticillium dahliae* Kleb. EM
PLÂNTULAS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.) CV.
THEOBAHIA, POR BENZOTIADIAZOLE (BTH)**

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

Orientador

Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

[REDACTED]
N.º [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

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

Cavalcanti, Leonardo Sousa

Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. Em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) cv. Theobahia, por benzotiadiazole (BTH) / Leonardo Sousa Cavalcanti. -- Lavras : UFLA, 2000.

82p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Murcha de *Verticillium*. 2. Cacau. 3. Resistência induzida. 4. Benzotiadiazole. 5. Peroxidases. 6. Polifenoloxidasas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.74944

LEONARDO SOUSA CAVALCANTI

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Verticillium dahliae* Kleb. EM
PLÂNTULAS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.) CV.
THEOBAHIA, POR BENZOTIADIAZOLE (BTH)**

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

APROVADA em 07 de julho de 2000

Prof. Dulcinéia de Carvalho - UFLA

Prof. Mário Sobral de Abreu - UFLA



Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende
DFP-UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Severino e Ivanilde (*In memoriam*) pela dedicação e amor,
verdadeiros exemplos de vida que me conduziram e continuam conduzindo na
busca dos meus objetivos e ideais de vida**

**Aos meus irmãos Júnior, Sérgio, Cláudio, Sueli e Ricardo
pela felicidade de sermos verdadeiros irmãos e amigos**

**A toda minha família pelo apoio e incentivo
sempre demonstrados, sem os quais
seria impossível alcançar
meus objetivos**

**A Jane pelo carinho e compreensão
sempre dedicados de forma
tão sincera**

**A minha filha Amanda
por ser a principal
razão do meu
esforço**

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade da realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Dulcinéia de Carvalho e Mário Sobral de Abreu pelos ensinamentos transmitidos e pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende pela amizade e orientação sempre dedicadas de forma sincera e objetiva.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos e pelos exemplos de profissionais comprometidos com a pesquisa e educação.

À professora Maria das Graças Cardoso, do Departamento de Química, por tornar disponível o tempo e recursos para a realização dos trabalhos.

Ao professor Daniel Ferreira Furtado pela orientação nas análises estatísticas dos experimentos.

Ao professor Rildo Sartori Barbosa Coêlho pelo incentivo, apoio e amizade que tanto me estimularam para a realização deste curso.

A Novartis Agribusiness Ltda., na pessoa do pesquisador Roberto M. de Castro, pela confiança e pelo apoio concedido de maneira irrestrita durante a condução dos experimentos.

Aos colegas de turma, Fábio Ramos e Mauro Júnior, pelo apoio e amizade sempre demonstrados em todos os momentos deste inesquecível convívio.

Aos amigos Eduardo, Márcia, Luciana, Luíza e Jair pelos agradáveis momentos de companheirismo e amizade.

Aos amigos Maria Luíza, Luís Henrique, Givaldo Niella, Wirton Macedo, Anderson Marcos, e em especial a Gutemberg Barone, pela colaboração e apoio na realização dos trabalhos.

A todos os técnicos administrativos do DFP, em especial a Ana Maria, Dilurdes, Eloisa, Carlos Roberto, Leisa e Marcos, pela paciência e amizade.

Aos bolsistas de Iniciação Científica e estagiários, Carla, Patrícia, Aparecida, Hernani, Fabiano, Sérgio, e em especial a Gabriela Carolina, que tanto colaboraram para a condução dos experimentos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o cumprimento desta importante etapa na minha vida.

**Sinceramente
Agradeço**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral.....	02
2 Referencial Teórico.....	04
3 Referências Bibliográficas.....	22
CAPÍTULO 2: Efeito da época de aplicação e dosagem de benzotiadiazole na indução de resistência a <i>Verticillium dahliae</i> Kleb. em plantas de cacauero	31
1 Resumo.....	32
2 Abstract.....	33
3 Introdução.....	34
4 Material e Métodos.....	36
4.1 Material Vegetal.....	36
4.2 Aplicação do BTH.....	36
4.3 Preparo do inóculo e inoculação.....	37
4.4 Avaliação.....	37
4.5 Delineamento experimental e análise dos dados.....	38
5 Resultados e Discussão.....	39
6 Conclusões.....	51
7 Referências Bibliográficas.....	53
CAPÍTULO 3: Estudo de respostas de defesa no processo de resistência induzida por benzotiadiazole na interação cacauero x <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	56
1 Resumo.....	57
2 Abstract.....	58
3 Introdução.....	59
4 Material e Métodos.....	62
4.1 Material Vegetal.....	62
4.2 Aplicação do BTH.....	62
4.3 Preparo do inóculo e inoculação.....	62
4.4 Análises para detecção de fitoalexinas.....	63
4.4.1 Preparo e extração das amostras.....	63
4.4.2 Separação das substâncias.....	63
4.4.3 Monitoramento.....	64
4.5 Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas.....	65
4.5.1 Preparo do material vegetal e obtenção das amostras.....	65

4.5.2 Determinação da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas.....	65
5 Resultados e Discussão.....	67
6 Conclusões.....	74
7 Referências Bibliográficas.....	75
ANEXOS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AS	Ácido salicílico
INA	Ácido 2,6 di-cloro isonicotínico
BTH	Éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotióico
i. a.	Ingrediente ativo
CV	Coefficiente de variação
cv.	Cultivar
m.f.	Matéria fresca
min.	Minutos
mM	Mili molar
°C	Graus Celsius
POs	Peroxidases
PPOs	Polifenoloxidasas
ppm	Parte de um soluto em um milhão de partes de um solvente
SAR	Resistência sistêmica adquirida
ISR	Resistência sistêmica induzida
AIP	Ácido 2-aminoindano-2-fosfônico
PAL	Fenilalanina amônia-liase
nm	Nanômetros
Abs	Absorbância
ϕ	Diâmetro
TLC	Cromatografia de camada fina
BDA	Batata-dextrose-agar

RESUMO

CAVALCANTI, Leonardo Sousa. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) por benzotiadiazole (BTH). Lavras: UFLA, 2000. 82p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)*

Mecanismos de defesa em plantas podem ser ativados como respostas a variadas formas de estresse, seja por agentes abióticos, como radiações e ferimentos mecânicos, ou por agentes bióticos, como insetos e microrganismos. Estas respostas podem se expressar pelo aumento na atividade de enzimas, envolvidas na síntese de compostos tóxicos, como fitoalexinas e fenólicos, ou de polímeros relacionados com a estrutura física da parede celular vegetal, como lignina e suberina. Em plantas resistentes, a ativação de genes de defesa ocorre de forma rápida e coordenada, resultando em um eficiente processo de contenção do desenvolvimento do patógeno. Porém, o mesmo não acontece em materiais suscetíveis, que sucumbem ao ataque de microrganismos patogênicos. A resistência induzida (RI) representa uma alternativa promissora para a utilização de materiais suscetíveis, mas que possuem características agronômicas desejáveis, sem a alteração do genoma da planta. A molécula éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico (BTH) promoveu grandes avanços na utilização da RI no manejo de doenças de plantas. Os objetivos do presente trabalho foram identificar as melhores época de aplicação e dosagem do BTH e estudar possíveis mecanismos, como produção de fitoalexinas e acúmulo de lignina e compostos fenólicos, envolvidos na resistência induzida em plântulas de cacauero a *Verticillium dahliae*. Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil. Para o sucesso da utilização da indução de resistência, é necessário que a molécula elicitora seja aplicada na época e dosagem correta, em cada interação. No estudo das melhores época de aplicação e dosagem observou-se a predominância da época de aplicação sobre a dosagem, sendo identificada a época referente a 15 dias antes da inoculação do patógeno como a melhor para a aplicação do BTH. A produção de fitoalexinas não foi detectada nas condições e metodologia utilizadas neste estudo. As atividades de peroxidases e polifenoloxidasas foram superiores nas plantas tratadas com BTH (com e sem a inoculação de *V. dahliae*) em relação às plantas testemunhas e apenas inoculadas com o fungo, indicando uma efetiva participação destas respostas de defesa na resistência de plântulas de cacauero a *V. dahliae*.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Orientador) e Mário Sobral de Abreu - UFLA.

ABSTRACT

CAVALCANTI, Leonardo Sousa. Induction of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. in cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) by benzothiadiazole (BTH). Lavras: UFLA, 2000. 82p. (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

Defense mechanisms in plants may be activated as responses to several stress agents, by abiotic agents as radiation or mechanical wounding or by biotic agents such insects and microorganisms. These responses could be expressed as increases in enzyme activities, involved with toxic compounds synthesis like phytoalexins and phenolics, or polymers related to physical structure of the plant cell wall, such as lignin and suberin. In resistant plants, the defense gene activation occurs rapidly and coordinately, resulting in an efficient process of pathogen growth impairment. However, the same responses do not occur in susceptible plants, which succumb to pathogen attack. The induced resistance may be a promising alternative for utilization of susceptible cultivars with good agronomic characteristics, without plant genome modification. The substance benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carboxylic acid S-methyl ester (BTH) has promoted a great advance in the utilization of induced resistance for plant disease management. The purposes of the present study were to identify the best time of application and dosages of BTH and to investigate the possible mechanisms of defense activation, such as phytoalexin production and lignin and phenolic compounds deposition, involved in the induced resistance process in cocoa seedlings to *Verticillium dahliae*. The experiments were carried out at the greenhouse and laboratories of the Department of Plant Pathology of Universidade Federal de Lavras, MG, Brazil. For induced resistance success it is needed to spray the elicitor molecule on plants at the correct time and dosage, at each plant-host interaction. It was observed a predominance of effect of time of application over dosage, being found as best for BTH application, the time of 15 days before pathogen inoculation. Phytoalexin production was not detected under conditions and methodology used in this study. Peroxidase and polyphenol oxidase activities were higher in plants treated with BTH (with or without inoculation with *V. dahliae*), when compared to control seedlings and seedlings inoculated with the pathogen only, indicating an effective role of these defense responses in induced resistance of cocoa seedlings to *V. dahliae*.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende (Major Professor) and Mário Sobral de Abreu - UFLA.

CAPÍTULO 1

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Verticillium dahliae* Kleb. EM
PLÂNTULAS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.), CV.
THEOBAHIA, POR BENZOTIADIAZOLE (BTH)**

1 INTRODUÇÃO GERAL

A constante necessidade humana de controlar as doenças ocorrentes em plantas exploradas racionalmente tem ocasionado graves desequilíbrios no ambiente devido ao uso indiscriminado de defensivos químicos, resultando na contaminação de alimentos, animais e reservas hídricas, ocasionando a redução na qualidade e na expectativa de vida da população mundial.

Além destas conseqüências, a pressão de seleção exercida no ambiente pelo uso de defensivos e pelo estreitamento da base genética das culturas têm provocado o surgimento de novas raças de patógenos, mais agressivas, aumentando consideravelmente as perdas e os custos na produção.

Diante disto, é necessário que se busquem alternativas mais racionais para um adequado programa de manejo de doenças de plantas através da associação de medidas culturais, aplicação de defensivos químicos, controle biológico e resistência genética, derivada da utilização de cultivares resistentes, obtidas em programas de melhoramento genético direcionados a realidades locais.

Entretanto, um dos maiores obstáculos ocorrentes durante o desenvolvimento de programas de melhoramento genético visando resistência às doenças é, sem dúvida, a dificuldade de obtenção de materiais vegetais com elevado nível de resistência, aliada ao alto potencial de produtividade e características comerciais concernentes à maior aceitação do produto. Todavia, materiais que apresentam essas características geralmente não possuem genes de resistência, ou os mesmos não se expressam no tempo e local necessários à ativação de respostas de defesa da planta. A fim de suplantar esta limitação, a indução de resistência vem sendo muito estudada atualmente, inclusive sendo utilizada em escala comercial no intuito de se preservar o uso de cultivares com

alto potencial agrícola, porém apresentando suscetibilidade a doenças economicamente importantes.

A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência por meio da utilização de agentes externos, sem qualquer alteração do genoma da planta (Stadnik, 2000), ocorrendo de maneira não-específica, através da ativação de genes de defesa que codificam para diversas respostas de defesa, tais como proteínas PR (p. ex. quitinases e glucanases); enzimas envolvidas na rota de síntese de fitoalexinas, como a fenilalanina amônia-liase; acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do microrganismo, entre outros.

Um grande avanço na utilização da indução de resistência ocorreu após a identificação de uma nova molécula, o estér S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotióico (BTH), que tem sido utilizado como indutor de resistência em diversas espécies vegetais, como trigo, fumo, pepino, tomate e *Arabidopsis* sp. Desta forma, a indução de resistência através da aplicação de BTH necessita de estudos envolvendo outros patossistemas, visto que pode representar uma ferramenta útil em um programa racional e eficiente de manejo de doenças de plantas.

As limitações existentes à aplicação de defensivos agrícolas tradicionais no cultivo racional do cacau, aliadas à escassez de materiais vegetais com elevado nível de resistência, fazem com que a utilização da resistência induzida represente uma alternativa viável no combate às principais doenças desta importante cultura.

O presente trabalho teve como objetivos estudar a possibilidade do uso e os possíveis mecanismos envolvidos na resistência induzida mediada pelo benzotiadiazole a *Verticillium dahliae* Kleb., em plântulas de cacauero suscetíveis a esse patógeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do cacau

O gênero *Theobroma* pertence a família Sterculiaceae e consta de 20 espécies arbóreas perenes, estando incluídas, entre elas, algumas exploradas racionalmente, como o cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) e o cacauzeiro (*T. cacao*). Esta última movimentou a gigantesca indústria do chocolate, extraído das amêndoas do seu fruto, que representa uma das principais fontes de divisas do setor agrícola brasileiro. No Brasil, o cultivo é realizado em dez Estados da União, sendo a Bahia o principal produtor, seguido pelos Estados do Pará, Rondônia e Espírito Santo. O país já atingiu a posição de segundo maior produtor mundial nos anos 70, porém se encontra atualmente como quarto maior produtor, estando atrás de Costa do Marfim, Gana e Indonésia (Niella, 1997).

Devido ao restrito conhecimento sobre a variabilidade genética desta espécie, grandes dificuldades têm sido encontradas no melhoramento desta cultura. Tais dificuldades restringem o uso do controle genético no combate a doenças que são responsáveis por elevadas perdas na produção de cacau em diversas regiões produtoras. Dentre estas doenças, destacam-se a vassoura-de-bruxa, causada por *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, que é a principal doença desta cultura, sendo responsável por sérios prejuízos econômicos e sociais; a podridão parda, causada por *Phytophthora palmivora*; e a murcha-de-Verticillium, que tem como agente causal *Verticillium dahliae* (Luz et al., 1997).

2.2 A murcha de *Verticillium*

De natureza polífaga, *V. dahliae* pode atacar espécies como tomate, pimentão, berinjela e algodão, causando sintomas típicos de murcha vascular, como aumento do ângulo de inserção das folhas em relação ao caule (epinastia) e posterior amarelecimento, murchamento e necrose, com consequente morte e queda das mesmas. Internamente, pode ser observado o típico escurecimento dos vasos do xilema devido ao acúmulo de pigmentos fenólicos oxidados, liberados pelas células parenquimáticas adjacentes ao xilema no interior dos vasos. Este sintoma ocorre desde a raiz até as nervuras, embora seja mais facilmente visualizado na região do caule, pela exposição do lenho infectado, através de cortes transversais e longitudinais (Resende, 1994; Luz *et al.*, 1997).

O gênero *Verticillium* está classificado atualmente como fungo mitospórico, pertencente a ordem Moniliales, família Moniliaceae, tendo como principais espécies *V. dahliae* e *V. albo-atrum*, que são distinguidas taxonomicamente pela presença de microescleródios na primeira. Apresenta conídios unicelulares hialinos isolados ou agrupados, formados em conidióforos também hialinos, eretos, com ramificações verticiladas (Menezes e Oliveira, 1993).

Em cacauero, a murcha de *Verticillium* representa um sério fator limitante da produção em algumas das principais regiões produtoras do mundo, principalmente em condições de deficiência hídrica, com períodos prolongados de seca e posterior reabastecimento do suprimento de água do solo (Almeida, Almeida e Lima, 1993). O patógeno requer temperaturas em torno de 25 a 28° C e condições de umidade moderadas, podendo ser totalmente inibido em temperaturas pouco mais altas (30° C) e umidade relativa do ar elevada (Resende, Flood e Cooper, 1995).

Fragments de plantas infectadas podem constituir fonte de inóculo para plantas saudáveis, uma vez que o fungo pode sobreviver em tecidos vegetais ou no

solo, na forma de microescleródios, por longo período de tempo. O manejo desta doença está fundamentado na utilização da resistência genética, associada a medidas culturais, como o uso de mudas isentas do patógeno, eliminação de resíduos vegetais infectados, irrigação e adubação equilibradas, e aplicação de fungicidas sistêmicos. O controle químico pode ser utilizado de forma curativa, uma vez a doença normalmente ocorre em reboleiras, o que permite um controle local, visando evitar a disseminação do patógeno para plantas próximas àquelas infectadas. (A aplicação de fungicidas de maneira generalizada torna-se economicamente inviável devido à impossibilidade de controlar um fungo de solo em um cultivo perene (Resende, 1994; Luz *et al.*, 1997).)

Apesar da resistência genética ser a base para o manejo desta doença, reduzido número de cultivares apresentam satisfatório nível de resistência aliado a características agronômicas desejáveis.

A resistência induzida pode, diante destas dificuldades, representar uma importante alternativa adicional para o manejo desta importante doença da lavoura cacaueteira.

2.3 Resistência induzida

Os primeiros relatos sobre indução de resistência a patógenos datam de 1901, em trabalhos realizados por Ray e Beauverie, ambos com a interação *Botrytis cinerea* x *Begonia* sp. (Kessman *et al.*, 1994). Apesar da existência de outros estudos nas cinco décadas subsequentes, somente em 1961 a resistência induzida foi alvo de análise mais detalhada, através da pré-inoculação de plantas de fumo com o vírus do mosaico do fumo. Tal procedimento conferiu proteção contra outros vírus (Ross, 1961) e resultou na concepção do termo "resistência sistêmica adquirida (SAR, systemic acquired resistance), designando as respostas de defesa induzidas de forma sistêmica pela interação com fatores

externos, como radiação ultravioleta, produtos químicos e estruturas de microrganismos (Ryals *et al.*, 1996).

Um grande número de espécies vegetais tem demonstrado capacidade de desenvolver resistência sistêmica adquirida após estímulo por um elicitor, sendo esta resposta geralmente inespecífica, conferindo resistência a uma série de patógenos (Morris *et al.*, 1998).

Dentre as espécies vegetais cultivadas, o fumo (*Nicotiana tabacum* L.) é uma das mais estudadas no âmbito da resistência induzida, havendo relatos em interações com patógenos fúngicos, como *Peronospora parasitica*, *Cercospora nicotianae* e *P. tabacina*, os vírus da necrose (TNV) e do mosaico (TMV) do fumo e as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Erwinia carotovora* (Vernooij *et al.*, 1995).

Plantas de pepino também vêm sendo muito utilizadas, apresentando rápidas e eficientes respostas de defesa quando pré-inoculadas com elicitores, a *Colletotrichum lagenarium*, *P. lacrymans* (Siegrist, Jeblick e Kauss, 1994; Kunz, Schurter e Maetzke, 1997), *Pythium ultimum* (Benhamou e Bélanger, 1998b) e *Sphaerotheca fuliginea* (Daayf, Schmitt e Bélanger, 1997).

Em tomateiro, a resistência induzida tem sido muito estudada, principalmente nas interações com *Phytophthora infestans* (Kunz, Schurter e Maetzke, 1997; Anfoka e Buchenauer, 1997) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou, Lafontaine e Nicole, 1994; Benhamou e Lafontaine, 1995; Benhamou e Bélanger, 1998a).

Quanto ao aspecto molecular, diversos modelos têm sido propostos para um melhor entendimento da interação planta-patógeno (Gabriel e Rolfe, 1990), possibilitando inclusive a compreensão das conseqüentes alterações na planta decorrentes do processo de indução de resistência.

Na maioria destes modelos, evidencia-se a necessidade de ocorrência da interação entre uma molécula elicitora e um receptor na planta (Ebel e Mithöfer,

1998). Para que ocorra a ativação coordenada dos genes de defesa de maneira que a planta possa se defender do ataque de um patógeno qualquer, é necessário o reconhecimento, por parte da planta, de um produto codificado pelo patógeno, como proteínas, peptídeos, oligo ou polissacarídeos (Young, Shah e Klessig, 1997). Com a interação entre tais elicitores e os receptores, geralmente codificados pelos genes de resistência da planta, terão início processos como fosforilação de proteínas, fluxo de íons, liberação de espécies reativas de oxigênio, configurando a etapa de transdução de sinais. Além destes processos primários de sinalização, ocorre o acúmulo de moléculas secundárias, que podem desencadear um processo generalizado de defesa na tentativa de bloquear o desenvolvimento do patógeno, confinando-o ao local de penetração (Dixon, Harrison e Lamb, 1994).

2.4 Sinalização no processo de resistência induzida

A diferença determinante entre resistência e suscetibilidade está na capacidade das plantas reconhecerem o patógeno invasor e ativarem, de maneira rápida e efetiva, seus mecanismos de defesa (Yang, Shah e Klessig, 1997). A ativação rápida e coordenada de genes que governam esses mecanismos possibilitará a expressão da resistência (Ward *et al.*, 1991), através da restrição do crescimento do patógeno, confinando-o a uma pequena área ao redor do local de penetração (Klessig e Malamy, 1994). Tal restrição pode ser devida à necrose localizada, caracterizada por reação de hipersensibilidade ou pela ocorrência de alterações estruturais e bioquímicas nas células adjacentes ao sítio de infecção. Essas alterações podem ser caracterizadas pelo aumento da atividade de enzimas como a fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidase (envolvidas na síntese de fenilpropanóides e lignina), acúmulo de calose e compostos fenólicos, síntese de glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, produção de inibidores de proteinases, e

de enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanases e quitinases, além de liberação de espécies reativas de oxigênio, como O_2 e H_2O_2 (Gilchrist, 1998).

Quando este complexo processo de defesa ocorre em plantas naturalmente suscetíveis ou com baixo nível de resistência apenas, devido ao tratamento com agentes elicitores, o mesmo tem sido denominado de "resistência sistêmica adquirida" (SAR) (Ryals *et al.*, 1996).

Para que plantas com um sistema de defesa supostamente ineficiente possam se defender do ataque de um patógeno em potencial, é necessário que ocorra a prévia ativação deste sistema, através da interação entre receptores, geralmente localizados na membrana plasmática vegetal, e moléculas elicitoras capazes de sinalizar para o processo de defesa. O sucesso do processo de resistência sistêmica adquirida parece estar relacionado à capacidade de geração, por parte das plantas, de uma molécula sinalizadora secundária, responsável pela amplificação dos sinais primários de reconhecimento (Yang, Shah e Klessig, 1997), possibilitando a tradução destes sinais em respostas de defesa que ocorrem em células distantes do sítio de infecção (Klessig e Malamy, 1994).

O ácido salicílico (AS) tem sido apontado como um possível sinal endógeno secundário (Conti *et al.*, 1996; Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997) devido ao seu aumento em plantas inoculadas com agentes infecciosos ou tratadas com compostos químicos, e à alta correlação entre a concentração de AS e a resistência a doenças.

Evidência conclusiva sobre o envolvimento do AS na resistência sistêmica adquirida foi relatada por Gaffney *et al.* (1993) através da transferência do gene *nahG*, isolado de *P. putida*, para plantas de fumo. Este gene codifica para a enzima salicilato hidroxilase, que converte o AS em catecol, o qual não apresenta capacidade de induzir respostas de defesa. As plantas transformadas não acumulavam AS e, paralelamente, não apresentavam

resistência induzida, sendo, conseqüentemente, suscetíveis ao ataque de patógenos.

Outra forte evidência de que o AS apresenta alta correlação com a expressão de SAR é obtida pelo estudo da rota biossintética do AS, que se origina da fenilalanina, a qual é convertida em ácido *trans*-cinâmico pela PAL, enzima-chave na rota de fenilpropanóides e lignina. A partir de rotas oxidativas e não oxidativas, o ácido cinâmico é convertido a ácido benzóico, que é hidrolizado na posição C-2 do carbono estrutural, reação catalisada pela enzima BA2H (2-hidroxilase do ácido benzóico), formando o AS (Ryals *et al.*, 1996). Através da utilização do ácido 2-aminoindano-2-fosfônico (AIP), um potente inibidor da atividade da PAL, Mauch-Mani e Slusarenko (1996) obtiveram o bloqueio da rota de síntese de fenilpropanóides, com conseqüente mudança na reação de plantas de *Arabidopsis* resistentes a *P. parasitica*. Com a aplicação exógena de AS, os efeitos do AIP sobre a resistência das plantas foram revertidos, o que torna notória a função da PAL em gerar precursores do AS e a participação deste no processo de resistência sistêmica adquirida.

Apesar destas evidências, a correlação entre SAR e acúmulo de AS, embora seja relatada em grande número de interações, parece não ocorrer de forma generalizada, uma vez que a ativação de genes de defesa pode ocorrer através de rotas independentes do AS (Penninckx *et al.*, 1996; Vallélian-Bindschedler, Métraux e Schweizer, 1998; Vidal *et al.*, 1998).

O modo de ação e a translocação do AS no processo de SAR continua desconhecido até o presente momento, o que dificulta o entendimento do papel deste composto no metabolismo vegetal de plantas que apresentam a capacidade de expressar este tipo de resistência. Alguns autores relatam um significativo aumento do AS em tecidos vegetais não infectados e distantes do sítio de infecção, como em plantas de pepino inoculadas com TNV, nas quais se verificou um aumento de 50 % na concentração de AS em tecidos sadios,

sugerindo que este seja translocado a partir do ponto de infecção para outras partes da planta (Mölders, Buchala e Métraux, 1996). Entretanto, fortes evidências apresentam uma tendência à não aceitação desta afirmação como regra. Rasmussen, Hammerschmidt e Zook (1991), também trabalhando com plantas de pepino, verificaram a expressão de SAR, mesmo após a retirada de folhas inoculadas com *P. syringae* pv. *lacrymans*, previamente ao acúmulo de AS no floema das plantas, indicando que outra molécula sinal tenha translocado e sido responsável pela ativação de genes relacionados a SAR. Recentemente, o AS tem sido relatado como um possível inativador de um regulador negativo de SAR, a proteína *SN1*, que suprime a *Npr1*, uma outra proteína, da qual a resistência sistêmica adquirida, induzida por patógenos necrotróficos ou por AS, é altamente dependente (Carrington *et al.*, 1999). Em infecções virais, o AS parece não só estar relacionado com a interferência no processo de replicação como também, na restrição do movimento das partículas virais nos tecidos vegetais (Naylor *et al.*, 1998). A falta de conhecimentos sobre a síntese e a degradação do AS pela planta contribui para que o modo de ação e a translocação deste importante composto permaneça uma incógnita no âmbito do processo de resistência sistêmica (Ryals *et al.*, 1996).

O ácido jasmônico e seu éster metil também têm sido relatados como possíveis mensageiros secundários na sinalização para a resistência sistêmica adquirida (Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997). O papel e o envolvimento do jasmonato no processo de sinalização, como uma molécula secundária, permanecem contraditórios. Mitchell e Walters (1995) verificaram o aumento na atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidases (POs) e lipoxigenase (LOX), relacionadas à produção de fitoalexinas e lignina, além da formação de papilas no sítio de penetração, na interação cevada x *E. graminis* f. sp. *hordei*, através da aplicação de jasmonato em folhas de plantas jovens. A produção de fitoalexinas e o acúmulo de ácido jasmônico também foram

observados em suspensão de células de arroz tratadas com o elicitor *N*-acetilquitoseptose. Este tratamento induziu o acúmulo de jasmonato previamente à produção de momilactona A, a principal fitoalexina produzida em arroz. A inibição da rota biossintética do jasmonato pela aplicação de um inibidor, o ibuprofen, reduziu significativamente a produção de momilactona A, a qual foi restabelecida através da aplicação de ácido jasmônico exógeno (Nojiri *et al.*, 1996). Embora estes resultados indiquem a participação deste composto na sinalização, alguns autores não observaram qualquer evidência significativa que confirme o envolvimento do jasmonato no processo de sinalização para resistência induzida (Schweizer, Gees e Möisinger, 1993; Kogel *et al.*, 1994).

Outro composto que possivelmente funciona como sinal endógeno no processo de resistência sistêmica adquirida é o etileno, entretanto este fato ainda não está comprovado. A inibição da rota de síntese deste hormônio através da utilização de um potente inibidor, a aminoetoxivinylglicina (AVG), não alterou a indução de β -1,3-glucanase e quitinase em vagens de ervilha, sugerindo que a produção pós-infeccional de etileno mais, do que uma causa de respostas de defesa, pode ser apenas um sintoma indireto da doença (Mauch, Hadwiger e Boller, 1984).

Sinais elétricos induzidos por ferimentos e um peptídeo, constituído de 18 aminoácidos, denominado sistemina, que é produzido em respostas a ataque de insetos, também têm sido propostos como sinais endógenos capazes de ativar mecanismos de defesas, como a produção de inibidores de proteinases (Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997). Porém, tal proposição necessita de maiores estudos, inclusive relacionados a um possível envolvimento na resistência induzida.

2.4 Resistência induzida por agentes de origem natural

Diversas moléculas de origem natural ou sintéticas vêm sendo utilizadas na indução do processo de defesa de plantas a uma variada gama de patógenos.

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 ainda polissacarídeos da parede celular vegetal (Hann, 1996).

As glucanas, constituídas de um polímero de unidades de glucose, estão presentes como um dos principais componentes na parede celular de todos os organismos pertencentes ao reino Fungi, excetuando os fungos do filo Zygomycota, que apresentam basicamente quitina e quitosana na sua parede celular (Deacon, 1997).

Resistência a algumas viroses tem sido conferida a espécies de fumo (*Nicotiana* spp.) através da utilização de glucanas, extraídas principalmente da parede celular de espécies de *Phytophthora*. Heinkel *et al.* (1992), utilizando a micolaminarana, uma β -1,3-glucana obtida da parede celular de *P. megasperma* Drechs. f. sp. *glycinea*, observaram a inibição de infecção inicial de plantas de *N. tabacum* e *N. glutinosa* pelo vírus do mosaico do fumo (TMV), reduzindo também a severidade do ataque dos vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e do vira-cabeça do tomateiro (TSWV) em plantas de *Datura stramonium* quando este elicitor foi aplicado em conjunto com o inóculo.

Estudando uma outra glucana purificada de *P. sojae* na produção de fitoalexinas isoflavonóides, Cosio *et al.* (1996) constataram o acúmulo de quievitona, medicarpina, pisatina e gliceolinas em plantas de feijão, alfafa, ervilha e soja, respectivamente. Os autores evidenciaram ainda uma alta afinidade deste elicitor com proteínas da membrana plasmática de células destas espécies, ratificando, desta maneira, a ocorrência de interação do tipo elicitor-receptor.

Glucanas extraídas da parede celular de fungos possuem uma alta afinidade com os sítios receptores da membrana plasmática vegetal. Além disto, estes elicitores apresentam uma capacidade inerente de, mesmo em baixas concentrações, ativar respostas de defesa na planta. Tal capacidade apresenta uma alta especificidade, uma vez que glucanas de bactérias simbiotes, como *Bradyrhizobium japonicum*, não ativam tais respostas, podendo inclusive atuar como supressores quando associadas a elicitores fúngicos (Mithöfer *et al.*, 1996).

Após a interação entre elicitador e receptor, ocorre a secreção, por parte da planta, de enzimas degradadoras de parede, como a β -1,3-endoglucanase, ocorrendo a degradação da parede celular fúngica, com a consequente liberação de grande quantidade de glucanas, o que irá desencadear uma série de mecanismos, dentre eles a produção de enzimas envolvidas na rota de síntese de fitoalexinas e lignina, como a fenilalanina amônia-liase (PAL), acúmulo de calose e compostos fenólicos e produção de outras enzimas envolvidas na patogênese, como quitinase, polifenoloxidase e peroxidase (Okinaka *et al.*, 1995).

Derivados de quitina, um polímero de N-acetilglucosamina, também são constituintes da parede celular da maioria dos fungos, e podem induzir respostas de defesa em diversas espécies vegetais. Um dos mais utilizados é a quitosana, um polímero de unidades de β -1,4-glucosamina, que tem sido relatado como potente indutor de respostas de defesa, inclusive apresentando maior eficácia que as glucanas extraídas de *Phytophthora* spp. Esta superioridade evidencia-se com a mais rápida indução do processo de explosão oxidativa devido, possivelmente, ao mais alto grau de polimerização em relação às glucanas, o que aumenta a possibilidade da ocorrência de interação com os sítios receptores da membrana plasmática vegetal (Kauss, Jeblick e Domard, 1989).

A indução de resistência mediada por quitosana tem sido relatada em diversas interações pela ativação de mecanismos de resistência como produção de quitinases e β -1,3-glucanases, fitoalexinas e compostos fenólicos (p.ex. cumarina) (Conrath, Domard e Kauss, 1990; Benhamou, Lafontaine e Nicole, 1994), que têm sido relatados nos estudos de indução de resistência com compostos derivados de quitina. Outra resposta comumente relatada em estudos utilizando quitosana é a formação de caloses, que consistem no acúmulo de glucanas no tecido vegetal (Kauss *et al.*, 1994). Este mecanismo foi observado em plantas de tomate (Benhamou, Kloepper e Tuzun, 1998; Benhamou, Lafontaine e Nicole, 1994) e soja (Kohle, Young e Kauss, 1984), sendo o mesmo altamente dependente de cálcio (Kohle *et al.*, 1985), concomitante à alta capacidade da quitosana em liberar este elemento das células vegetais (Young e Kauss, 1983).

Outros derivados de quitina, como N-acetiloligosacarídeos, que possuem um nível de polimerização mais baixo que quitosana, também mostraram-se eficientes em ativar a expressão de genes que codificam para proteínas de defesa em plantas de importância agrícola como cevada (Kaku *et al.*, 1997) e arroz (Kuchitsu, Kikuyama e Shibuya, 1993; He *et al.*, 1998).

Compostos de natureza glicoprotéica também foram isolados de células de diversos patógenos e relatados como capazes de induzir respostas de defesa, como lignificação, produção de fitoalexinas e de compostos fenólicos (Vidhyasekaran, 1997). Em estudos com a plantas de trigo, Kogel *et al.* (1989) também detectaram a lignificação dos tecidos em resposta ao tratamento com uma glicoproteína isolada de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Em plantas de algodão, uma glicoproteína purificada de *V. dahliae* também foi capaz de induzir o acúmulo de fitoalexinas (Davis, Low e Heinstein, 1998).

Porém, os elicitores que mais têm chamado a atenção dos pesquisadores são peptídeos purificados de *Cladosporium fulvum*, na interação com tomateiro.

Estes elicitores, denominados *avr4* e *avr9*, somente se expressam na presença do hospedeiro, apresentando alta especificidade e correspondência com os genes *Cf-4* e *Cf-9* do tomateiro. Esta interação caracteriza um modelo tipicamente gene-a-gene, e a sua descoberta tem contribuído significativamente para o entendimento da base molecular da resistência (Laugé e De Wit, 1998)

Peptídeos apresentando alta capacidade elicitora também foram isolados de várias espécies de *Phytophthora*, sendo denominados elicinas, como a criptogaina (*P. cryptogea*), cinamonina (*P. cinnamomi*), capsiceina (*P. capsici*) e parasiticeina (*P. parasitica*) (Pernollet *et al.*, 1993).

A importância desses elicitores na patogênese pode ser ilustrada com um recente estudo realizado por Tepfer *et al.* (1998) sobre a interação *Phytophthora* x fumo. Os autores, através da inserção em plantas de fumo de um gene que codifica para β -criptogaina, um potente elicitor produzido pela maioria das espécies de *Phytophthora*, obtiveram resistência a *Ph. parasitica* var. *nicotianae*, que naturalmente não produz este elicitor, sendo patogênico a *Nicotiana* spp. Ou seja, a ausência da capacidade de produzir este elicitor representa uma característica co-evolutiva desta espécie fúngica com a planta, sendo um fator determinante da sua patogenicidade.

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 de crescimento de plantas" (PGPR's) (Romeiro, 2000). A maneira como estes organismos atuam sobre patógenos ainda parece estar indefinida no meio científico, porém sabe-se que, além do efeito direto sobre alguns patógenos, as PGPR's podem ter um papel fundamental na ativação de respostas de defesas sistêmicas e inespecíficas, em um processo de indução de resistência que se apresenta fenotipicamente semelhante a SAR, denominado "resistência sistêmica induzida (ISR)". Embora SAR e ISR apresentem quadros finais de respostas similares, os mecanismos

bioquímicos que são ativados, como também a molécula endógena de sinalização no processo de SAR, parecem diferir daqueles ocorrentes em ISR. Em SAR ocorre a produção e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese, sendo este processo dependente da sinalização mediada pelo ácido salicílico, enquanto em ISR não ocorre o acúmulo de tais proteínas e a molécula endógena de sinalização parece não ser o ácido salicílico, sendo possivelmente relacionada a outras moléculas, como etileno e ácido jasmônico (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998).

2.5 - Resistência induzida por agentes sintéticos

A indução de mecanismos de defesa associados a SAR depende, primordialmente, de que ocorra uma rápida e coordenada ativação de genes de defesa (Ward *et al.*, 1991). Compostos de natureza sintética também podem levar à ativação destes genes, conferindo resistência a plantas de forma similar aos indutores bióticos (Kessmann *et al.*, 1994).

Uma das principais características dessas substâncias é a ausência de atividade antimicrobiana (Kunz, Schurter e Maetzke, 1997), divergindo dos químicos tradicionalmente utilizados no controle de fitopatógenos, os quais implicam em maiores riscos ao ambiente e ao surgimento de novas raças de um patógeno, resistentes ao princípio ativo destes compostos antimicrobianos.

O ácido salicílico (Figura 1) foi um dos primeiros compostos a serem utilizados, estando envolvido em variados processos do metabolismo vegetal, atuando inclusive como sinal endógeno no florescimento, respiração e resistência a doenças (Klessig e Malamy, 1994). Apesar de estar envolvido na ativação das respostas de defesa (Chen, Silva e Klessig, 1994), este composto apresenta características que inviabilizam o seu uso extensivo como indutor de resistência: 1) embora participe do processo de resistência sistêmica adquirida, possivelmente não é a molécula que transloca no processo de sinalização

(Vernoij *et al.*, 1994; Shulaev, Leon e Raskin, 1995) e 2) apresenta características fitotóxicas em algumas espécies vegetais (Kessman *et al.*, 1994).

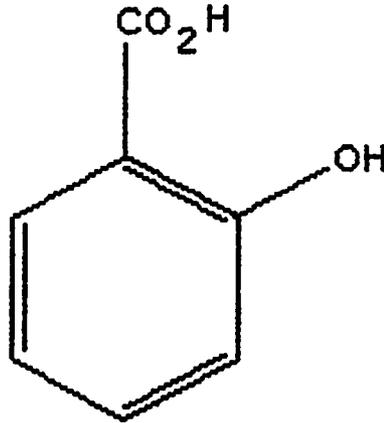


FIGURA 1 Estrutura química do ácido salicílico

Com isto, significativo número de novas moléculas tem sido desenvolvido nas últimas décadas, apresentando alta eficiência na indução de respostas de defesa, podendo ser utilizadas como ferramentas úteis, componentes de um moderno manejo de doenças de plantas (Dann *et al.*, 1996; Kunz, Schurter e Maetzke, 1997).

Um dos mais estudados compostos recentemente desenvolvidos é o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA; Figura 2) (Benhamou e Bélanger, 1998b), que confere resistência a *P. tabacina* em plantas de fumo, *Erwinia* em pereira, *Xanthomonas* em pimenteira, *Pyricularia oryzae* e *X. oryzae* em plantas de arroz (Kessmann *et al.*, 1994) e *E. graminis* f. sp. *hordei* em cevada (Kogel *et al.*, 1994), além de induzir o acúmulo de β -1,3-glucanases e quitinase em feijoeiro (Dann *et al.*, 1996).

Embora tenha sido, e ainda esteja sendo, utilizado em estudos sobre resistência induzida, o INA também apresenta certo grau de fitotoxidez em algumas espécies vegetais, característica que limita o seu uso em escala comercial (Görlach *et al.*, 1996).

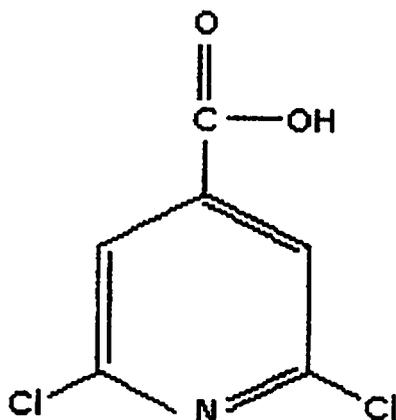


FIGURA 2 - Estrutura química do ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA)

O primeiro, e até o presente momento único composto liberado para utilização extensiva em plantios comerciais, é o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carboxílico (BTH; Figura 3), que além de não ter apresentado fitotoxidez, mostrou-se como o mais potente indutor de resistência quando comparado a AS e INA (Görlach *et al.*, 1996; Kunz, Schurter e Maetzke, 1997). Esta molécula possui características estruturais semelhantes a estes dois compostos, sendo caracterizada por um anel aromático com um grupo carboxila substituído e parecer atuar de maneira análoga ao AS como mensageiro secundário, mas de maneira independente deste ou de qualquer outra molécula

sinal, ativando o processo de sinalização e levando à expressão de genes relacionados a SAR (Benhamou e Bélanger, 1998a).

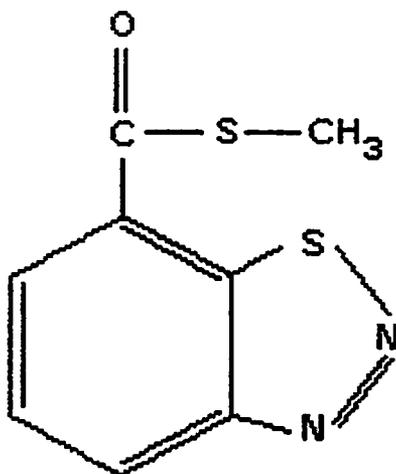


FIGURA 3 - Estrutura química do éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carboxílico (BTH)

O BTH tem se mostrado eficiente em induzir resistência em culturas de alto valor comercial, protegendo-as contra patógenos causadores de doenças de elevada importância econômica. Um dos mais bem sucedidos controles através da aplicação deste composto vem sendo obtido com a cultura do trigo, conferindo resistência a *E. graminis* f. sp. *tritici*, agente causal do oídio do trigo. Reduções nos sintomas da doença, na ordem de 35 %, foram observadas em campo pela aplicação de apenas 30 g do produto/ha (Görlach *et al.*, 1996). Os autores ainda observaram, nas plantas tratadas com BTH, um aumento na produção em torno de 18 %, superior àqueles obtidos com Tilt e Fenpropdin, produtos fungicidas tradicionalmente utilizados no combate a esta doença.

Outros químicos também apresentam capacidade de induzir resistência em plantas, porém sem ampla utilização devido à falta de um claro estabelecimento de relações com a resistência sistêmica adquirida.

Um destes, o Fosetyl-Al, apesar de ter sido relatado como indutor de fitoalexinas em citros, fumo e pimentão (Guest, 1984), também apresenta a capacidade de, em certas condições de incubação *in vitro*, ser degradado a ácido fosfórico, passando a apresentar características antifúngicas (Fenn e Coffey, 1984), o que o descaracteriza como um indutor de resistência adquirida.

Etefon, um agente que libera etileno (Ye, Pan e Kuc, 1992); ácido jasmônico (Cohen, Gisi e Niderman, 1993); sílicio (Chérif *et al.*, 1992); fosfatos (Gottstein e Kuc, 1989) e sais inorgânicos (Yoshikawa, Yamaoka e Takeuchi, 1993) são alguns dos compostos também relatados como elicitores de respostas de defesa, mas que não apresentam características favoráveis à utilização extensiva como um potencial composto indutor de resistência.

Maiores estudos sobre a possibilidade de uso de compostos indutores de resistência, como também sobre a forma de atuação destes, tornam-se necessários, uma vez que o processo de resistência induzida pode representar uma alternativa eficiente e uma medida componente em um moderno programa de manejo de doenças de plantas cultivadas, tendo como característica a eficácia, aliada a menores custos de produção e riscos para o homem e o meio ambiente.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, H. A.; ALMEIDA, L. C. C.; LIMA, A. A. Efeito da deficiência hídrica sobre o surgimento da murcha de *Verticillium* no cacauero. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Agrometeorologia**, v. 8, Santa Maria, RS, p. 187. 1993.
- ANFOKA, G.; BUCHENAUER, H. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 85-101, 1997.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, Dec. 1998a.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, p.13-21, 1998b.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, Berlin, v. 204, n. 1, p. 153-168, Jan. 1998.
- BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J. Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Planta**, Berlin, v. 197, n. 1, p. 89-102, Aug. 1995.
- BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n.12, p. 1423-1444, Dec. 1994.
- CARRINGTON, J. C.; BISSELIN, T.; COLLMER, A.; JONES, J. D. G. Highlights from the Ninth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 11, p. 2063-2069, Nov. 1999.

- CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D. F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, Madison, v. 262, n. 5141, p. 1883-1885, Dec. 1994.
- CHÉRIF, M.; BENHAMOU, N.; MENLIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 411-425, 1992.
- COHEN, Y.; GISI, U.; NIDERMAN, T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic acid methyl ester. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 10, p. 1054-1062. Oct. 1993.
- CONRATH, U.; DOMARD, A.; KAUSS, H. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, p. 152-155, 1990.
- 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*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, n. 6, p. 537-544, July. 1996.
- COSIO, E. G.; FEGER, M.; MILLER, C. J.; ANTELO, L.; EBEL, J. High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. **Planta**, Berlin, v. 200, n. 1, p. 92-99, Sept. 1996.
- DAAYF, F.; SCHMITT, A.; BÉLANGER, R. R. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 3, p. 719-727, Mar. 1997.
- DANN, E. K.; MEUWLY, P.; METRAUS, P.; DEVERALL, B. J. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and β -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 307-319, 1996.
- DAVIS, D. A.; LOW, P. S.; HEINSTEIN, P. Purification of a glycoprotein elicitor of phytoalexin formation from *Verticillium dahliae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.52, p. 259-273, 1998.

- DEACON, J. W. **Modern Mycology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1997. 303p.
- DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 479-501, 1994.
- EBEL, J.; MITHÖFER, A. Early events in the elicitation of plant defence. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 3, p. 335-348, Oct. 1998.
- FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Studies the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 6, p. 606-611, June. 1984.
- GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 365-391, 1990.
- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, Madison, v. 261, n. 5122, p. 754-756, Aug. 1993.
- GILCHRIST, D. G. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 393-414, 1998.
- GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUFF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p.629-643, Apr. 1996.
- GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 2, p. 176-179, Feb. 1989.
- GUEST, D. I. Modification of defense responses in tobacco and capsicum following treatment with fosetyl-Al [Aluminum tris o-ethyl phosphonate]. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 25, p. 125-134, 1984.

- HANN, M. G. Microbial elicitors and their receptor in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 387-412, 1996.
- HE, D-Y.; YAZAKI, Y.; NISHIZAWA, Y.; TAKAI, R.; YAMADA, K.; SAKANO, K.; SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, *N*-acetylchitoheptaose. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 12, p. 1167-1174, Dec. 1998.
- HEINKEL, C. M.; HUDSPETH, M. E. S.; MEGANATHAN, R.; ZINNEN, T. M. Further characterization of mycolaminaran-induced resistance: temperature sensitivity against tobacco mosaic virus and function against cauliflower mosaic virus and tomato spotted wilt virus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 6, p. 637-641, June. 1992.
- KAKU, H.; SHIBUYA, N.; XU, P.; ARYAN, A. P.; FINCHER, G. B. *N*-acetylchitoooligosaccharides elicit expression of a single (1→3)- β -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 1, p. 111-118, May. 1997.
- KAUSS, H.; JEBLICK, W.; DOMARD, A. The degrees of polymerization and *N*-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. **Planta**, Berlin, v. 178, n. 3, p. 385-392, June. 1989.
- KAUSS, H.; JEBLICK, W.; ZIEGLER, J.; KRABLER, W. Pretreatment of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 89-94, May. 1994.
- 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.
- KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, the Hague, v. 26, p. 1439-1458, 1994.
- KOGEL, K. H.; BECHOVE, U.; DRESCHERS, J.; MÜNCH, S.; ROMMÉ, Y. Acquired resistance in barley. The resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based

- mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 4, p. 1269-1277, Dec. 1994.
- KOGEL, G.; BEISSMANN, B.; REISENER, H. J.; KOGEL, K. H. A syngle glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cell walls elicits the hypersensitive lignification response in wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 33, p. 173-185, 1988
- KOHLE, H.; JEBLICK, W.; POTEN, F.; BLASCHEK, W.; KAUSS, H. Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process. **Plant Physiology**, St. Paul, v. 77, n. 3, p. 544-551, Mar. 1985.
- KOHLE, H.; YOUNG, D. H.; KAUSS, H. Physiological changes in suspension cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 33, n. 2, p. 221-230, Feb. 1984.
- KUCHITSU, K.; KIKUYAMA, M.; SHIBUYA, N. N-acetylchitoooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension rice cells. **Protoplasma**, Viena, v. 174, p. 79-81, 1993.
- KUNZ, W.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science**, New York, v. 50, p. 275-282, 1997.
- LAUGÉ, R.; DE WIT, P. J. G. M. Fungal avirulence genes: Structure and possible functions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 24, n. 3, p. 285-297, Aug. 1998.
- LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Cacau (*Theobroma cacao* L.): Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, 1997. v. 2, cap. 13. p. 611-655.
- MAUCH, F.; HADWIGER, L. A.; BOLLER, T. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. **Plant Physiology**, Rockville, v. 76, n. 3, p. 607-611, Nov. 1984.
- MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A. J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the

- resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 2, p. 203-212, Feb. 1996.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1993. 277 p.
- MITCHELL, A.; WALTERS, D. Systemic protection in barley against powdery mildew infection using methyl jasmonate. **Aspects of Applied Biology**, v. 42, p. 323-326, 1995.
- MITHÖFER, A.; BHAGWAT, A. A.; FEGER, M.; EBEL, J. Suppression of fungal β -glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. **Planta**, Berlin, v. 199, n. 2, p. 270-275, June. 1996.
- MÖLDERS, W.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J. P. Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 787-792, Oct. 1996.
- MORRIS, S. W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARRET, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C. C.; FREDERIKSEN, R. A.; BRANDHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced resistance responses in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 7, p. 643-658, July. 1998.
- NAYLOR, M.; MURPHY, A. M.; BERRY, J. O.; CARR, J. P. Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 9, p. 860-868, Sept. 1998.
- NIELLA, G. R. **Esporulação de *Crinipellis pernicioso* (Stabel) Singer em frutos de cacau (*Theobroma cacao* L.) no sudeste da Bahia e sensibilidade "in vitro" a quatro compostos sulfurados**. Lavras: UFLA, 1997. 60p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- NOJIRI, H.; SUGIMORI, M.; YAMANE, H.; NISHIMURA, Y.; YAMADA, A.; SHIBUYA, N.; KODAMA, O.; MUROFUSHI, N.; OMORI, T. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 2, p. 387-392, Feb. 1996.
- OKINAKA, Y.; MIMORI, K.; TAKEO, K.; KITAMURA, S.; TAKEUCHI, Y.; YAMAOKA, N.; YOSHIKAWA, M. A structural model for the

- mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 3, p. 839-845, Nov 1995.
- PENNINCKX, I. A. M. A.; EGGERMONT, K.; TERRAS, F. R. G.; THOMMA, B. P. H. J.; SAMBLANX, G. W. de; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J. P.; MANNERS, J. M.; BROEKART, W. F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, Berlin, v. 8, n. 12, p. 2309-2323, Dec. 1996.
- PERNOLLET, J. C.; SALLANKIN, M.; SALLE-TOURNE, M.; HUET, J. C. Elicitin isoforms from *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.42, p. 53-67, 1993.
- RASMUSSEN, J. B.; HAMMERSCHMIDT, 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, Dec. 1991.
- RESENDE, M.L.V. Vascular wilt of cocoa (*Theobroma cacao* L.), caused by *Verticillium dahliae* Kleb.: studies on pathogenicity and resistance. Bath, U.K.: University of Bath, 1994. (Ph.D. Thesis).
- RESENDE, M.L.V.; FLOOD, J.; COOPER, R.M. Effect of method of inoculation, inoculum density and seedling age at inoculation on the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium dahliae* Kleb. **Plant Pathology**, Oxford, v.44, n. 2, p.374-83, Apr. 1995.
- ROMEIRO, R. S. PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 23, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: GPF, 2000. p. 181-196.
- ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. **Virology**, New york, v. 14, p. 340-358, June 1961.
- RYALS, J.; NEUENSCHWANDER, U.; WILLITS, M.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, Oct. 1996.

- SCHWEIZER, P.; GEES, R.; MÖSINGER, E. Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, n. 2, p. 503-511, June 1993.
- SHULAEV, V.; LEON, J.; RASKIN, I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 10, p. 1691-1701, Oct. 1995.
- SIEGRIST, J.; JEBLICK, W.; KAUSS, H. Defense responses in infected and elicited cucumber (*Cucumis sativus* L.) hypocotyl segments exhibiting acquired resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 4, p. 1365-1374, Aug. 1994.
- STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 23, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: GPF, 2000. p. 176-181.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.
- TEPPER, D.; BOUTTEAUX, C.; VIGON, C.; AYMES, S.; PEREZ, V.; O'DONOHUE, M. J. HUET, J-C.; PERNOLLET, J-C. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 1, p. 64-67, Jan. 1998.
- VALLÉLIAN-BINDSCHEDLER, L.; MÉTRAUX, J. P.; SCHWEIZER, P. Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 7, p. 702-705, July 1998.
- VAN LOON, L. C.; 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.
- VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; AHL-GOY, P.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens does not require the accumulation of salicylic acid. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 8, n. 1, p. 228-234, 1995.

- VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; MORSE, A.; REIST, R.; KOLDITZ-JAWHAR, R.; WARD, E.; UKNES, S.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 7, p. 959-965, July 1994.
- VIDAL, S.; ERIKSSON, A. R. B.; MONTESANO, M.; DENECKE, J.; PALVA, E. T. Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 1, p. 23-32, Jan. 1998.
- VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms**. New York: Marcel Dekker, 1997. 553p.
- WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J. P.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 10, p. 1085-1094, Oct. 1991.
- YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes & Development**, New York, v. 11, p. 1621-1639, 1997.
- YE, X. S.; PAN, S. Q.; KUC, J. Specificity of induced systemic resistance as elicited by ethephon and tobacco mosaic virus in tobacco. **Plant Science**, Limerick, v. 84, n. 1, p. 1-9, 1992.
- YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.; TAKEUCHI, Y. Elicitors: their significance and primary models of action in the induction of plant defense reactions. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, n. 8, p. 1163-1173, Dec. 1993.
- YOUNG, D.H.; KAUSS, H. Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effects on membrane permeability. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73, n. 3, p. 698-702, Nov. 1983.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DA ÉPOCA DE APLICAÇÃO E DOSAGEM DE
BENZOTIADIAZOLE NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A
Verticillium dahliae Kleb. EM PLANTAS DE CACAUEIRO CV.
THEOBAHIA**

1 RESUMO

CAVALCANTI, Leonardo Sousa. Efeito da época de aplicação e dosagem de benzotiadiazole na indução de resistência a *Verticillium dahliae* em plântulas de cacauero. p. 31-55. Lavras: UFLA, 2000. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)*

O controle de doenças causadas por patógenos de solo apresenta grandes dificuldades devido à constante presença do agente causal na rizosfera das plantas. Estas dificuldades aumentam significativamente quando se trata de uma cultura perene, como o cacauero, cultivada de maneira extensiva e apresentando número reduzido de fontes de resistência, necessárias ao melhoramento genético. A resistência induzida representa uma medida promissora no manejo de doenças desta natureza, visto que possibilita a exploração de cultivares com boas características agrônômicas, porém apresentando suscetibilidade a doenças. Grande avanço neste campo ocorreu com a descoberta da molécula éster S-metil do ácido benzo-(1-2-3)-tiadiazole 7-carbotiólico (BTH), atualmente utilizada em escala comercial nos Estados Unidos e alguns países da Europa. Contudo, a eficiência deste composto é função, principalmente da época de aplicação e dosagem utilizada, sendo necessária a identificação destas variáveis em cada patossistema, uma vez que cada interação deve possuir um período próprio entre o reconhecimento do elicitor e a ativação de mecanismos de defesa. O presente trabalho teve como objetivo identificar as melhores época de aplicação e dosagem do BTH na interação cacauero x *Verticillium dahliae*. O BTH foi pulverizado via foliar, nas concentrações de 20 g e 60 g do i. a./100 L de água, em plântulas da cultivar Theobahia, aos 15, 07 e 03 dias antes da inoculação do patógeno. Foram avaliadas as variáveis índice de doença aos 30, 45 e 60 dias após a inoculação de *V. dahliae*, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), o peso fresco e altura das plantas aos 60 dias após a referida inoculação. O fator época de aplicação apresentou influência predominante ao fator dose, sendo identificada a época referente a 15 dias antes da inoculação como melhor período de aplicação do BTH. Reduções de até 55,4 % na severidade da doença e um acréscimo na ordem de 10,5 % no peso fresco e 35,7 % na altura das plantas foram observados em comparação com as plantas somente inoculadas com o fungo, evidenciando a eficácia do BTH como indutor de resistência em plântulas de cacauero suscetíveis a *V. dahliae*.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Orientador) e Mário Sobral de Abreu - UFLA.

2 ABSTRACT

CAVALCANTI, Leonardo Sousa. Effect of time of application and dosage of benzothiadiazole on induction of resistance to *Verticillium dahliae* in cocoa seedlings. p. 31-55. Lavras: UFLA, 2000. (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

The control of soilborne diseases has great difficulties due to a constant presence of the causal agent in plant rhizosphere. These difficulties increase significantly when the crop have a perennial cycle, as a cocoa tree, which is cultivated extensively and have reduced numbers of resistance sources, needed for genetic breeding. The induced resistance represents a promising strategy in integrated disease management for these diseases, because it makes possible the exploitation of cultivars with good agronomical characteristics, but susceptible to diseases. Great advance in this area occurred with the discovery of benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbotioic acid S-methyl ester (BTH), nowadays used in commercial scale in the USA and some European countries. However, efficiency of this compound is a function of time of application and dosage used, being needed the identification of these factors for each plant-pathogen interaction, considering that each interaction must have a distinct period between elicitor recognition and defense mechanism activation. The purpose of this study was to identify the best time of application and dosage of BTH in the cocoa x *Verticillium dahliae* pathosystem. BTH was sprayed on the leaves, at 20 g and 60 g of a. i./100 L of water, on cultivar 'Theobahia' seedlings, 15, 07 and 03 days before pathogen inoculation. Evaluations of disease index at 30, 45 and 60 days after pathogen inoculation, and of area under disease progress curve (AUDPC), fresh weight and height of seedlings, all at 60 days after inoculation, were carried out. The time of application factor showed predominant influence over dosage factor, being 15 days before inoculation, the best time for application of BTH. Decreases until 55.4 % in the disease index, increases of 10.5 % in fresh weight and 35.7 % in height were observed, when compared to control seedlings only inoculated with the pathogen, evidencing the efficacy of BTH as a resistance activator in cocoa seedlings susceptible to *V. dahliae*.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende (Major Professor) and Mário Sobral de Abreu -UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A indução de resistência vem sendo, atualmente, alvo de diversos estudos envolvendo os mais variados tipos de patossistemas vegetais. Tais estudos vislumbram a utilização da mesma como uma promissora medida de controle de doenças, que pode, juntamente com outras tradicionalmente utilizadas, compor um adequado manejo, focalizando a eficiência e a redução de custos e perdas ocasionadas por doenças de plantas.

Agentes bióticos, como organismos não-patogênicos ou atenuados, e abióticos, como quitosana, ácido salicílico, INA e ácido β -amino butírico, têm sido utilizados na indução de respostas de defesa em diversas espécies vegetais, contra infecções virais, fúngicas e bacterianas (Lawton *et al.*, 1996).

Em cacaueteiro, a utilização da resistência induzida possibilitou a redução da incidência da principal doença da cultura, a vassoura de bruxa, causada por *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, apresentando resultados superiores àqueles obtidos com o uso de fungicidas tradicionalmente utilizados no controle desta doença (Resende *et al.*, 1999) e da murcha-de-Verticillium (Cavalcanti, Resende e Andrade, 2000), causada por *Verticillium dahliae* Kleb., uma importante doença vascular, cujo controle químico é economicamente inviável e o número de materiais apresentando um nível de resistência satisfatório é reduzido.

Dentre os produtos sintéticos, uma molécula muito utilizada atualmente é o éster S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbotióico (BTH), que tem apresentado resultados promissores em diversos patossistemas vegetais (Gorlach *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996; Benhamou e Bélanger, 1998 a;b; Morris *et al.*, 1998). Este composto é, até o momento, o único considerado indutor de resistência que está liberado para o uso extensivo em

certos países da Europa e nos Estados Unidos (CIBA, 1996). No Brasil, esta molécula encontra-se em fase de testes, apresentando resultados significativos em algumas culturas como tomate (Silva, Kimati e Castro, 1999), sorgo (Osswald *et al.*, 1998), citros (Pascholati, 1999) e cacau (Resende *et al.*, 2000). Entretanto, a falta de conhecimentos sobre as melhores época de aplicação e dosagem induz a resultados não conclusivos sobre a eficiência e possibilidade de uso desse produto, uma vez que cada interação patógeno-hospedeiro deve possuir um período próprio, necessário para a sinalização e a consequente ativação de genes de defesa da planta relacionados à resistência sistêmica adquirida. Deste modo, torna-se necessário a realização de estudos detalhados para a identificação das melhores época de aplicação e dosagem deste produto, viabilizando a utilização da indução de resistência como um moderno componente em um racional e eficiente programa de manejo de doenças de plantas.

O objetivo do presente trabalho foi identificar as melhores época de aplicação e dosagem do benzotiadiazole na indução de resistência de plantas de cacauero a *V. dahliae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

As plantas foram obtidas a partir de sementes da cultivar Theobahia (que apresenta reação de suscetibilidade a *V. dahliae*), pré-germinadas em vermiculita e semeadas em sacos de polietileno contendo substrato à base de areia, esterco e solo, na proporção 1:1:1, sendo adubadas aos 30 e 60 dias após a germinação, com adubo NPK na fórmula 4-14-8, e irrigadas diariamente. As mesmas foram mantidas em estufa climatizada até o momento da instalação do experimento, cerca de 90 dias após germinadas, quando foram levadas à casa-de-vegetação, com uma temperatura média de 25° C e umidade relativa variando entre 50 e 80 %, sendo dispostas em bancadas de aço, conforme o delineamento utilizado.

A fim de evitar a queima de folhas devido à ação do vento e de luz intensa, o que poderia vir a mascarar os sintomas de seca e queda de folhas, foram fixadas uma proteção plástica lateral e uma cobertura escura a 1,0 m das plataformas das bancadas, sendo as mesmas mantidas até o final do experimento.

4.2 Aplicação do BTH

O produto comercial à base de benzotriazolol (Bion[®]) foi aplicado aos 15, 07 e 03 dias antes da inoculação do patógeno, via pulverização foliar, sendo testadas duas dosagens: 1) 20 g i. a./100 L e 2) 60 g i. a./100L de água. As plantas controle absolutas e inoculadas com o patógeno, porém sem aplicação do BTH, foram separadas das demais, apenas retornando ao local do experimento no dia seguinte, evitando, assim, o contato com o produto ocasionado por deriva no momento da aplicação. A pulverização do BTH representou o tratamento

indutor, ou seja, o tratamento inicial responsável pela ativação prévia dos mecanismos de defesa (Pascholati e Leite, 1995)

4.3 Preparo do inóculo e inoculação

O isolado de *V. dahliae*, obtido de plantas de morangueiro (*Fragaria* sp.) provenientes do município de Venda Nova, ES, foi cultivado em meio de cultura BDA durante 25 dias, em câmara de crescimento, a uma temperatura em torno de 25° C, em regime de 12h claro / escuro. Em seguida, transferiu-se disco de meio de cultura colonizado para placa de Petri contendo BDA. O inóculo foi preparado a partir de colônias com 25 dias de incubação, adicionando-se 20 mL de água destilada em cada placa, efetuando-se a raspagem da colônia com escova de cerdas macias. A suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze, sendo a concentração ajustada para de 1×10^7 conídios / mL de água, em câmara de Neubauer.

A inoculação foi realizada através do método de punção na haste, conforme descrito por Bugbee e Presley (1967), com seringa plástica e agulha estéreis. A agulha foi inserida em um ângulo de 45° com o caule, até atingir o lenho da planta. Uma única gota da suspensão de inóculo (cerca de 10 µl) teve acesso ao córtex, onde foi rapidamente absorvida. As plantas testemunhas foram, de maneira similar, injetadas com água destilada esterilizada. A inoculação de *V. dahliae* representou o tratamento desafiador (Pascholati e Leite, 1995).

4.4 Avaliação

As avaliações foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias após a inoculação, através da determinação da severidade da doença, utilizando-se uma escala de notas preconizada por Sidhu e Webster (1977), com notas variando de 0 a 4. As notas 0, 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente a 0%, 1-25%, 26-50%, 51-

75% e >75% de redução de área foliar devido à clorose, necrose e murcha. A partir desses dados, foi calculado o índice de doença, baseado na seguinte fórmula:

$$\text{Índice de doença} = \frac{\text{soma das notas das folhas por planta}}{\text{número total de folhas por planta}}$$

O peso fresco e a altura das plantas foram mensurados 60 dias após a inoculação com *V. dahliae*, ou seja, ao final das avaliações referentes à variável índice de doença. Além destas variáveis, foi realizada a análise da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) utilizando-se os valores das três avaliações do índice de doença.

4.5 Delineamento experimental e análise dos dados

O experimento foi delineado em blocos casualizados, com seis tratamentos originários de arranjo fatorial 03 (épocas de aplicação) x 02 (doses), somados a três tratamentos adicionais, formados pelas plantas testemunhas, somente inoculadas com *V. dahliae* (T_{vd}), pulverizadas com BTH (T_{BTH}) e sem qualquer inoculação ou pulverização (T_{ABS}). Cada tratamento foi constituído por 04 repetições, sendo as mesmas formadas por 09 plantas. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico SAS (SAS Institute, 1997).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação da variável índice de doença, realizada aos 30 dias após a inoculação, a menor severidade foi observada nas plantas pulverizadas com BTH aos 15 dias antes da inoculação do patógeno, independentemente da dosagem utilizada. A redução da severidade da doença nas plantas deste tratamento atingiu 55,4 % em relação às plantas pertencentes ao tratamento controle positivo (T_{vd}), apenas inoculadas com o patógeno (Figura 1; Tabela 1A). Mediante a análise de regressão linear dos dados desta avaliação, confirmou-se o melhor desempenho das plantas pulverizadas com BTH 15 dias antes da inoculação, sendo os valores da variável índice de doença decrescentes concomitante ao aumento do tempo entre a aplicação do BTH e a inoculação desafiadora (Figura 6; Tabela 6A).

Na segunda avaliação da variável índice de doença, realizada 45 dias após a inoculação, verificou-se, através da análise de variância dos dados (Tabela 2A), a ausência de diferenças significativas, a 5 % de probabilidade, entre os tratamentos originários do fatorial dose x época. Apesar da ausência de diferenças entre os tratamentos do fatorial, constata-se uma redução de 17,1% no índice de doença nas plantas pulverizadas com o BTH 15 dias antes da inoculação, quando comparadas ao controle positivo (Figura 2).

Nas duas primeiras avaliações da variável índice de doença, não se observou qualquer efeito da dose em nenhum dos tratamentos pulverizados com o BTH.

Através da observação da Figura 3 e do Quadro de análise de variância dos dados referentes à terceira avaliação da variável índice de doença (Tabela 3A), realizada 60 dias após a inoculação, verifica-se a ocorrência de interação significativa entre os fatores dose utilizada e época de aplicação do BTH.

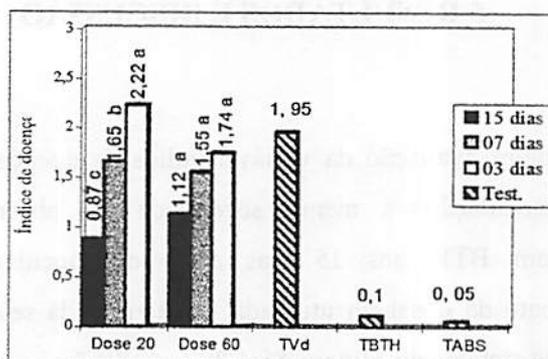


FIGURA 1 - Índice de doença na 1ª avaliação, 30 dias após a inoculação com *V. dahliae* (Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, apenas dentro de cada dose)

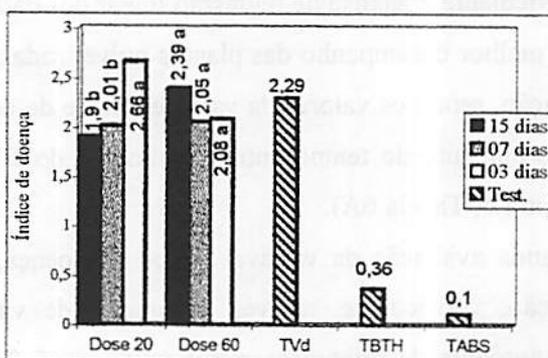


FIGURA 2 - Índice de doença na 2ª avaliação, 45 dias após a inoculação com *V. dahliae* (Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, apenas dentro de cada dose)

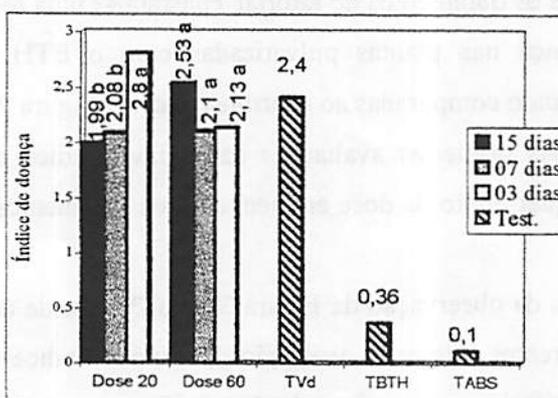


FIGURA 3 - Índice de doença na 3ª avaliação, 60 dias após a inoculação com *V. dahliae* (Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, apenas dentro de cada dose)

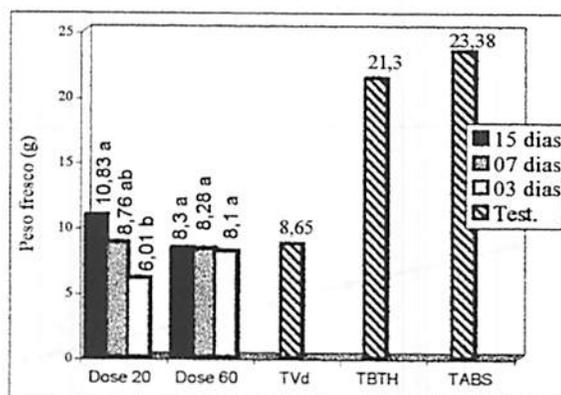


FIGURA 4 - Peso das plântulas aos 60 dias após a inoculação com *V. dahliae* (Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, apenas dentro de cada dose)

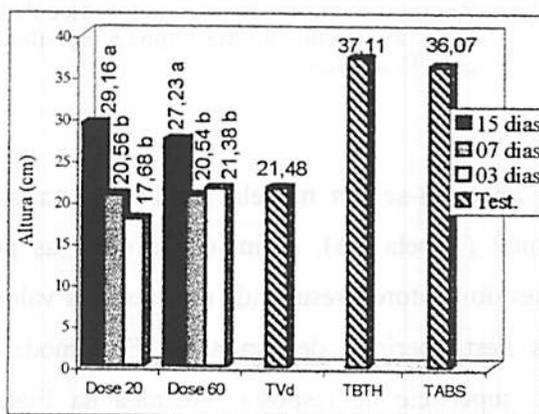


FIGURA 5 - Altura das plântulas aos 60 dias após a inoculação com *V. dahliae* (Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, apenas dentro de cada dose)

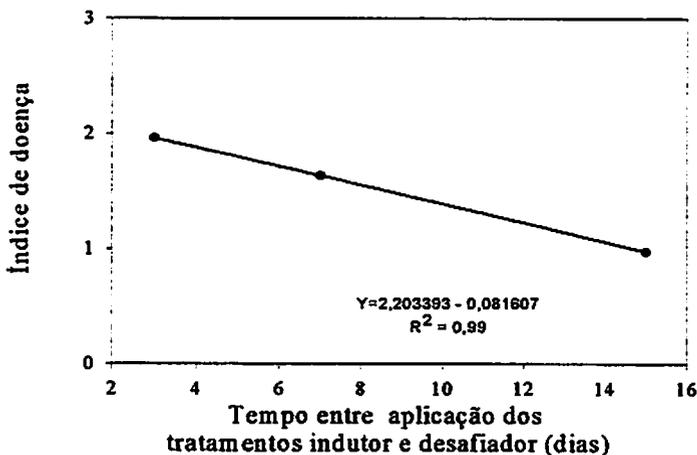


FIGURA 6 - Regressão linear da variável Índice de doença na 1ª avaliação, 30 dias após a inoculação com *V. dahliae*

Com isto adequou-se um modelo matemático, através de análise de regressão polinomial (Tabela 7A), a fim de se obter as possíveis melhores combinações desses dois fatores, resultando nos menores valores para a variável índice de doença neste período de avaliação. Este modelo possibilitou a obtenção de uma superfície de resposta, ilustrada na Figura 7. Através da observação das cotas obtidas nesta superfície, identificam-se algumas melhores combinações destes dois fatores, como, por exemplo, a utilização da dose de 20 g do i.a./100 L de água, aplicados aos 15 dias antes da inoculação com *V. dahliae* (Figura 8). A redução na severidade da doença neste tratamento atingiu cerca de 20% em relação às plantas somente inoculadas com o fungo. Em uma análise mais detalhada desta figura, identifica-se uma tendência de redução na severidade da doença quando da pulverização de uma menor dose em uma maior

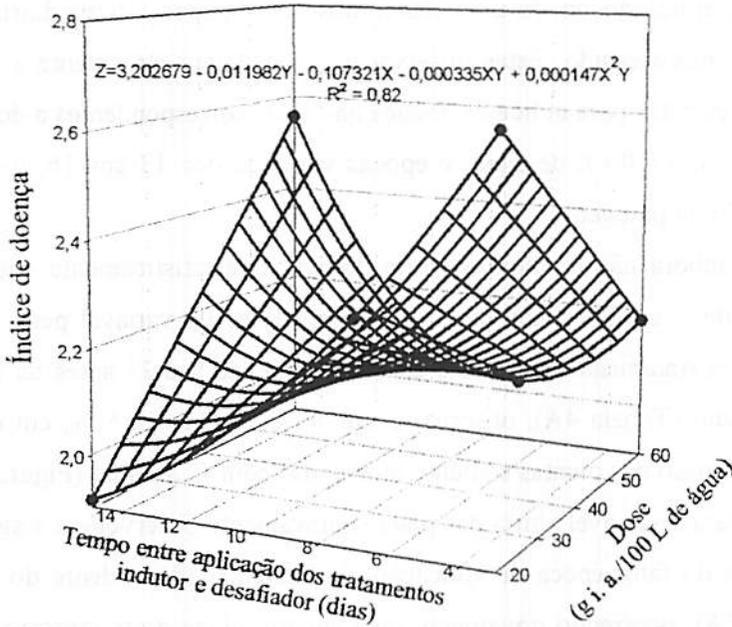


FIGURA 7 - Estimativa da superfície de resposta da interação Tempo entre aplicação dos tratamentos indutor e desafiador (X) x Dose (Y) do BTH, na 3ª avaliação da variável Índice de doença, 60 dias após inoculação com *V. dahliae*

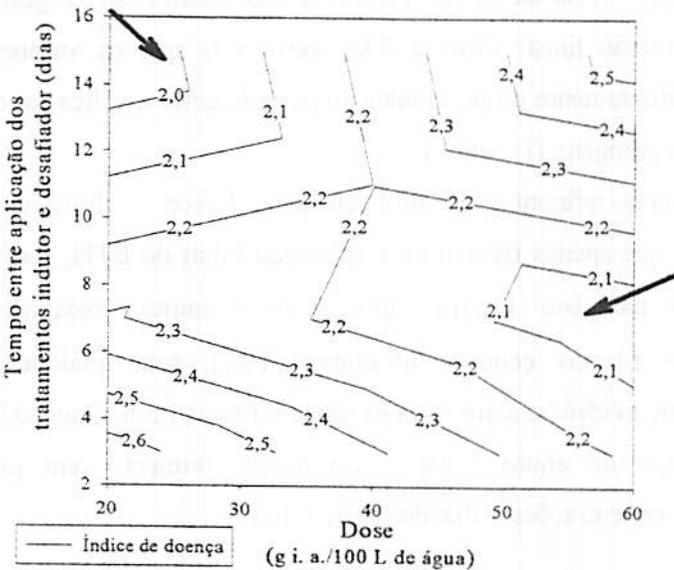


FIGURA 8 - Cotas de índice de doença na interação Época de aplicação x Dose do BTH na 3ª avaliação, 60 dias após a inoculação com *V. dahliae*



época de aplicação ou de uma maior dose em épocas intermediárias àquelas utilizadas neste estudo. Estas observações evidenciam claramente a ocorrência de menores cotas para índice de doença nas áreas correspondentes a doses entre 20 e 26 g i. a./100 L de água, e épocas variando dos 13 aos 16 dias antes da inoculação do patógeno .

Embora não tenham ocorrido diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade, entre os valores da variável peso fresco das plantas nos tratamentos em que o BTH foi aplicado aos 15 dias antes da inoculação do patógeno (Tabela 4A), observa-se um acréscimo de 10,5 %, em média, em relação ao peso das plantas somente inoculadas com *V. dahliae* (Figura 4).

Para a variável altura das plantas, novamente observou-se a significativa influência do fator época de aplicação, de maneira independente do fator dose (Tabela 5A), ocorrendo novamente uma superioridade do tratamento em que o BTH foi pulverizado aos 15 dias antes da inoculação desafiadora. Quando comparadas com altura das plantas do controle positivo, percebe-se um aumento, na ordem de 35,7 %, na altura das plantas destes tratamentos (Figura 5). Pela análise de regressão linear (Tabela 8A), verifica-se que os valores obtidos apresentam-se diretamente proporcionais ao período entre a aplicação de BTH e a inoculação do patógeno (Figura 9).

Os valores referentes às variáveis peso fresco e altura das plantas (Figuras 4 e 5) que apenas receberam a aplicação foliar do BTH, sem posterior inoculação do patógeno (T_{BTH}), apresentam-se muito próximos àqueles verificados nas plantas controle absolutas (T_{ABS}), sem qualquer tipo de tratamento, o que evidencia a ausência de características fitotóxicas do BTH, ou de qualquer tipo de efeito negativo no desenvolvimento, em plantas de cacauero, nas concentrações utilizadas neste estudo.

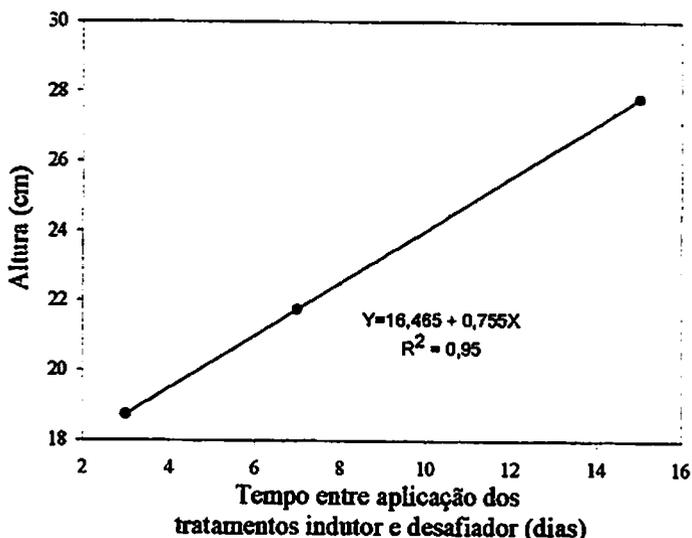


FIGURA 9 - Regressão linear da variável Altura das plantas de cacauero, 60 dias após a inoculação com *V. dahliae*

Na análise da área abaixo da curva de progresso da doença (Figuras 10 a 18), confirmou-se o melhor desempenho das plantas pulverizadas com BTH 15 dias antes da inoculação desafiadora, principalmente na dosagem de 20 g do i. a./100 L de água, em relação aos demais tratamentos.

Estes resultados evidenciam a notória influência da época de aplicação do BTH, se sobrepondo ao efeito da dose utilizada, o que confirma a estrita necessidade de um período entre a aplicação indutora e a inoculação do patógeno (Uknes *et al.*, 1996). Romeiro (1999) menciona, inclusive, que para o processo de resistência induzida ser caracterizado, não deve haver aumento dos níveis de respostas de defesa com o concomitante aumento da dose utilizada do indutor de resistência. Apesar do número reduzido de estudos relacionados com a indução de respostas de defesa em plantas com estrutura semelhante à do cacauero, o período entre a aplicação indutora e a desafiadora difere

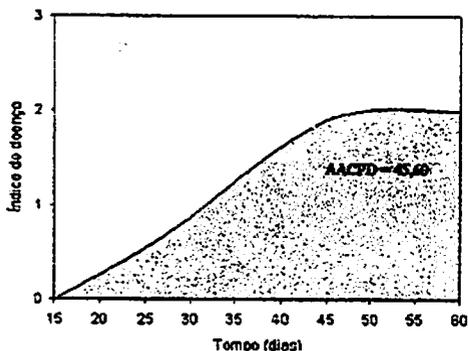


FIGURA 10 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento com 20g de i. a. / 100 L de água, aos 15 dias antes da inoculação de *V. dahliae*

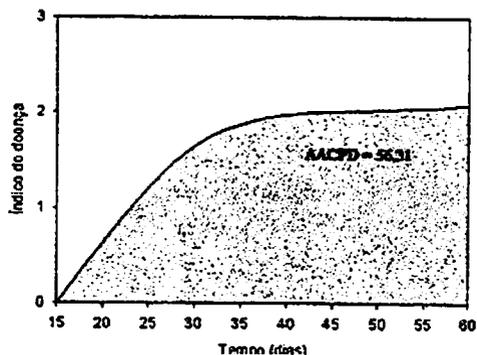


FIGURA 11 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento com 20g de i. a. / 100 L de água, aos 07 dias antes da inoculação de *V. dahliae*

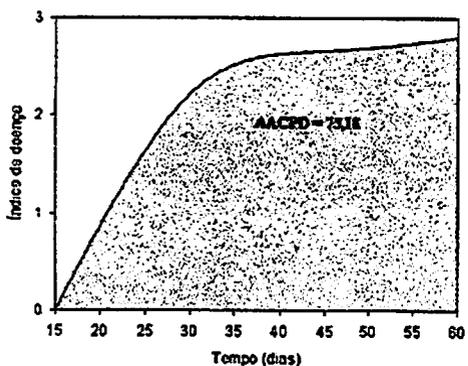


FIGURA 12 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento com 20g de i. a. / 100 L de água, aos 03 dias antes da inoculação de *V. dahliae*

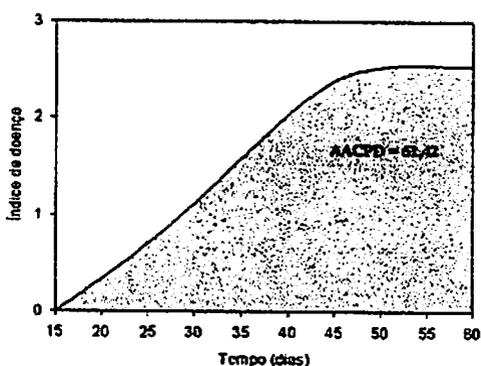


FIGURA 13 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento com 60g de i. a. / 100 L de água, aos 15 dias antes da inoculação de *V. dahliae*

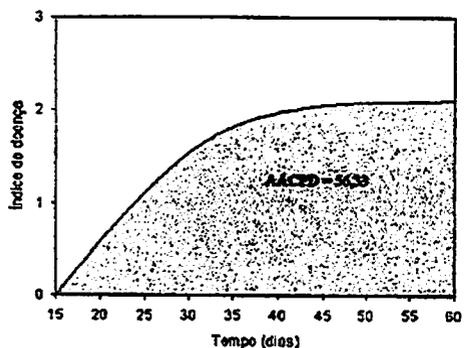


FIGURA 14 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento com 60g de i. a. / 100 L de água, aos 07 dias antes da inoculação de *V. dahliae*

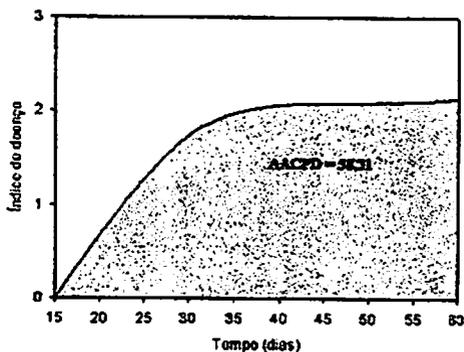


FIGURA 15 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento com 60g de i. a. / 100 L de água, aos 03 dias antes da inoculação de *V. dahliae*

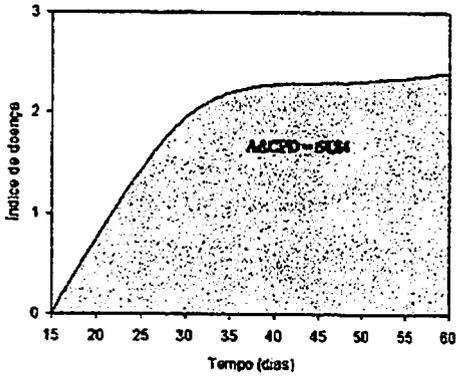


FIGURA 16 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento apenas inoculado com *V. dahliae* (T vd)

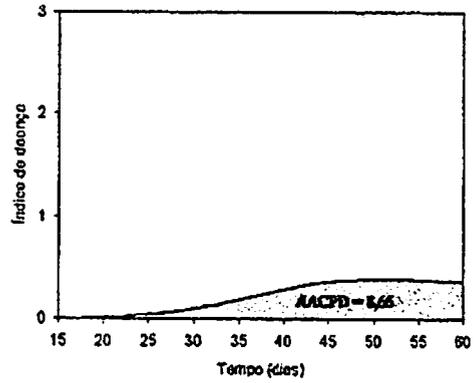


FIGURA 17 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento apenas pulverizado com BTH (T BTH)

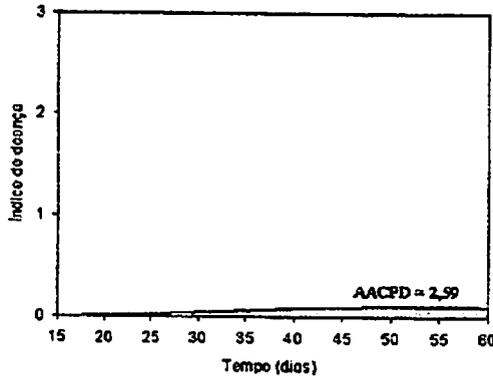


FIGURA 17 - Área abaixo da curva de progresso da doença referente ao tratamento testemunha (T ABS)

significativamente daquele observado em plantas pouco lenhosas, como tomate e pepino, que apresentam respostas de defesas efetivas ativadas em um curto espaço de tempo (3 a 7 dias), quando induzidas pela aplicação de químicos ou através da pré-inoculação com não-patógenos (Benhamou e Bélanger, 1998 a;b).

Em cacauero, este período parece compreender um espaço de tempo mais longo, como relatado por Resende *et al.* (2000), em plantas que apresentaram resistência induzida contra *C. pernicioso*. Neste estudo, os autores obtiveram uma maior redução na incidência de vassoura de bruxa nas plantas pulverizadas com o BTH aos 30 dias antes da inoculação do patógeno, sendo os resultados deste tratamento superiores àqueles obtidos com a aplicação do BTH aos 03 e 15 dias antes da inoculação.

Embora o fator época de aplicação tenha apresentado uma maior influência sobre os valores da variável índice de doença na primeira e segunda avaliações, o fator dose pode ter sido determinante da severidade da doença na terceira avaliação desta variável. Nesta ocasião, nos tratamentos nos quais a aplicação do BTH foi realizada aos 15 dias antes da inoculação, percebe-se uma relação direta do aumento da dose do produto com a elevação dos valores desta variável. Isto indica que neste período de avaliação, a máxima redução na severidade da doença pode ser obtida com combinações ótimas desses dois fatores (Figura 8).

A maior severidade da doença, observada concomitante ao aumento da dose do BTH, pode ser devida à aproximação das doses estimadas dos valores limites, ou seja, de valores máximos, a partir das quais a eficiência do produto na indução de respostas de defesa é reduzida de maneira significativa. Na interação entre sorgo e *Colletotrichum graminicola*, Osswald *et al.* (1998), verificaram uma relação direta entre o aumento da dose do BTH e a produção de fitoalexinas nos tecidos de mesocótilos, sendo que nesta interação o possível valor limite está em torno de 50 ppm do BTH (Pascholati, 1999).

A análise de tais resultados leva à indicação de que a utilização do benzotiadiazole na indução de respostas de defesa pode ser estendida a outros patossistemas. Em cacauero, esta ferramenta pode representar uma alternativa eficiente na busca de medidas de manejo integrado de importantes doenças,



FIGURA 19 - Plântulas de cacaueteiro cv. Theobahia 60 dias após a inoculação com *V. dahliae* (Esquerda-plântula apenas inoculada; Direita - plântula inoculada 15 dias após a pulverização com BTH, na dosagem de 20 g i. a./ 100 L de água).

como a vassoura-de-bruxa, a podridão parda e a murcha-de-Verticillium, responsáveis por elevada redução na produtividade desta cultura. Contudo, torna-se necessária a realização de estudos similares a este para que a máxima eficiência do produto seja atingida, uma vez que cada interação possui uma época específica para a sinalização, e conseqüente ativação de mecanismos de defesa, que podem, em conjunto com medidas tradicionais de combate a patógenos vegetais, compor um adequado programa de manejo de doenças de plantas.

6 CONCLUSÕES

1. A melhor época de aplicação do benzotiadiazole foi aos 15 dias antes da inoculação de *V. dahliae*, tanto para a variável índice de doença como para a variável altura das plantas.
2. A influência do fator época de aplicação apresentou-se superior ao fator dose em todas as avaliações, exceto na terceira avaliação da variável índice de doença, quando ocorreu a interação significativa entre esses dois fatores.
3. A menor área abaixo da curva de progresso da doença foi verificada no tratamento referente à dosagem de 20 g do i. a./100 L de água, aos 15 dias antes da inoculação do patógeno.
4. O fator dose do BTH não apresentou qualquer influência nas duas primeiras avaliações da variável índice de doença, como também nas avaliações referentes ao peso fresco e altura das plântulas.
5. Na terceira avaliação da variável índice de doença, realizada aos 60 dias, os menores valores desta variável podem ser obtidos mediante a utilização de combinações ótimas dos fatores época de aplicação e dosagem do BTH, como, por exemplo, época de aplicação entre 14 e 16 dias, com dose entre 20 e 25 g do i. a./100 L de água, ou ainda época entre 6 a 8 dias, com dose entre 50 e 60 g do i. a./100 L de água.

6. A menor dose utilizada (20 g do i.a./100 L de água) mostrou-se superior às demais doses utilizadas (60 g do i.a./100 L de água) e estimadas ($20 < x < 60$ g do i. a./100 L de água) na terceira avaliação da variável índice de doença.
7. O BTH não apresentou qualquer efeito fitotóxico neste experimento.
8. O tratamento com benzotiadiazole (BTH) foi significativamente eficaz em induzir resistência em plantas de cacauero inoculadas com um isolado patogênico de *V. dahliae*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R.; Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, Dec. 1998a.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R.; Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, p.13-21, 1998b.
- BUGBEE, W.M.; PRESLEY, T.J. A rapid inoculation technique to evaluate the resistance of cotton to *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, p.1264, 1967.
- CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V.; ANDRADE, G. C. G. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* por *Crinipellis pernicioso*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 23, 2000, Campinas. Anais Campinas: GPF, 2000. p. 246.
- CIBA. The plant activator: nature created the concept. Ciba-Geigh AG, 1996.35p.
- FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; GUT RELLA, M.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNESS, S.; RYALS, J. A benzothiadiazole derivate induces systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v.10, p. 61-70, 1996.
- GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUFF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p.629-643, 1996.
- LAWTON, K. A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 71-82, 1996.

- MORRIS, S. W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARRET, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C. C.; FREDERIKSEN, R. A.; BRANDHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v. 11, n.7, p. 643-658, July 1998.
- OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEME, L. C. D. T.; WULFF, N. A. Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo em resposta ao tratamento com o ativador de defesa vegetal 'Bion'. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, p. 266, 1999. Suplemento.
- PASCHOLATI, S. F. (Coord.). Conclusões do grupo de discussão Bioquímica fitopatológica e indução de resistência. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, p. 241, 1999. Suplemento.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds.) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*, São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-453.
- RESENDE, M. L. V.; GIOVANINI, G. R.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; NOJOSA, G. B. A.; CASTRO, R. M. Eficácia comparativa do benzotiadiazole (BTH) na proteção de mudas de cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso*, agente da vassoura-de-bruxa. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, p. 320, 1999. Suplemento.
- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; 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 (BTH). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT Software: changes and enhancements trough release 6.12. Cary, 1997.
- 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, R. A.; KIMATI, H.; CASTRO, R. M. Indução de resistência em plantas de tomate contra requeima e mancha bacteriana pequena pela aplicação de Acibenzolar-S-Methyl. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, p. 330, 1999. Suplemento.

UKNES, S.; VERNON, B.; MORRIS, S.; CHANDLER, D.; STEINER, H.; SPECKER, N.; HUNT, M.; NEUENSCHWANDER, U.; LAWTON, K.; STARRET, M.; FRIEDRICH, L.; WEIMANN, K.; NEGROTTO, D.; GÖRLACH, J.; LANAHAN, M.; SALMERON, J.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistance crops. *New Phytologist*, London, v. 133, p. 3-10, 1996.

CAPÍTULO 3

**ESTUDO DE RESPOSTAS DE DEFESA NO PROCESSO DE
RESISTÊNCIA INDUZIDA POR BENZOTIADIAZOLE NA
INTERAÇÃO CACAUEIRO X *Verticillium dahliae* Kleb.**

1 RESUMO

CAVALCANTI, Leonardo Sousa. Estudo de respostas de defesa no processo de resistência induzida por benzotiadiazole na interação cacaueiro x *Verticillium dahliae* Kleb. Lavras: UFLA, 2000. p. 56-77. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)*

O processo de resistência induzida por benzotiadiazole (BTH) foi estudado na interação cacaueiro x *Verticillium dahliae*. As possíveis respostas de defesa induzidas por esse composto são caracterizadas pela produção de fitoalexinas e compostos fenólicos, expressão de proteínas como a peroxidase, enzima-chave na síntese de lignina, cujo acúmulo restringe o desenvolvimento do patógeno em uma pequena área em torno do ponto de infecção. O objetivo do presente estudo foi identificar as possíveis respostas de defesa na resistência induzida pela aplicação do BTH em plântulas de cacaueiro inoculadas com *V. dahliae*. Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação e laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. A produção de fitoalexinas foi analisada através de bioensaio em lâminas escavadas e aplicação de subamostras em placas de TLC para verificação da porcentagem de inibição da germinação de conídios de *V. dahliae*. As atividades de peroxidases e de polifenoloxidasas foram avaliadas através da leitura, em espectrofotômetro, da absorbância (a 470 nm), da reação das amostras em guaiacol, na presença ou não de H₂O₂, respectivamente. Não foram observadas diferenças na germinação de conídios entre as amostras provenientes de plântulas tratadas com BTH + *V. dahliae* e testemunhas, tanto no bioensaio como nas placas de TLC. As atividades das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas foram superiores nas plantas pulverizadas com BTH em relação às plântulas testemunhas e apenas inoculadas com o fungo. Portanto, verifica-se que as respostas de defesa envolvidas na resistência induzida a *V. dahliae* em plantas de cacaueiro sejam possivelmente constituídas do acúmulo de lignina e outros compostos fenólicos.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Orientador) e Mário Sobral de Abreu - UFLA.

2 ABSTRACT

CAVALCANTI, Leonardo Sousa. Study of defense responses at the induced resistance process by benzothiadiazole in the cocoa seedlings x *Verticillium dahliae* interaction. Lavras, UFLA, 2000. p. 56-77. (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

The induced resistance by benzothiadiazole (BTH) in the cocoa seedlings x *Verticillium dahliae* interaction was studied. The possible defense responses induced by this compound are characterized for production of phytoalexins and phenolic compounds, protein expression as peroxidase, a key-enzyme in lignin synthesis, which in turn restricts pathogen growth in a small area around the penetration point. The present work was aimed at identifying defense responses in the induced resistance by BTH, in cocoa seedlings inoculated with *V. dahliae*. The experiments were carried out at greenhouse and laboratories of the Department of Plant Pathology, Universidade Federal de Lavras, MG, Brazil. The phytoalexin production was tested by slides bioassay and application of samples on TLC plates, to verify the percentage of inhibition of *V. dahliae* conidial germination. The peroxidase and polyphenol oxidase activities were evaluated by the absorbance at 470 nm in a spectrofotometer, of the reaction of samples on guaiacol in the presence or not of H₂O₂, respectively. No differences in conidial germination between seedlings treated with BTH + *V. dahliae* and control samples were detected, on slide bioassay, as well as in TLC plates. The peroxidase and polyphenol oxidase activities were higher in seedlings sprayed with BTH than in control seedlings and in seedlings inoculated with the pathogen only. Therefore, the possible defense responses involved in induced resistance to *V. dahliae* in cocoa seedlings were based on lignin and other phenolic compound accumulation.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende (Major Professor) and Mário Sobral de Abreu - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

As respostas de defesa de plantas ao ataque de microrganismos patogênicos são caracterizadas por uma série de mecanismos capazes de restringir o patógeno em uma área próxima ao sítio de infecção, impedindo o desenvolvimento do mesmo.

Dentre esses mecanismos, ênfase vem sendo dada às fitoalexinas, compostos pós-infeccionais de baixo peso molecular que apresentam atividade fungitóxica, e às proteínas relacionadas à patogênese, como quitinases e glucanases, que podem degradar a quitina e glucanas, polímeros estruturais da parede celular da maioria dos patógenos fúngicos, e peroxidase, enzima que está envolvida na formação de lignina, cujo acúmulo resulta em estruturas como papilas, halos e tubos ligníferos, que podem dificultar, ou mesmo impedir, o desenvolvimento do patógeno no tecido vegetal.

A velocidade com que os genes que codificam para a expressão destes mecanismos são ativados determina o nível de resistência natural do hospedeiro. Em plantas resistentes, a produção de fitoalexinas e proteínas de defesa ocorre rapidamente, o que leva a uma maior possibilidade de sucesso no processo de confinamento do patógeno. Porém, em plantas suscetíveis, o tardio reconhecimento do patógeno possibilita o seu desenvolvimento desde o local de penetração para o tecido vegetal sadio, o que altera significativamente o metabolismo vegetal, ocasionando o desvio de reservas nutricionais, culminando na redução da produção.

A aplicação de compostos indutores de resistência, como o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico (BTH), possibilita o prévio alerta do sistema de defesa vegetal em plantas suscetíveis, o qual é potencializado após a interação com o patógeno. Com isto, pode ocorrer o rápido

aumento na atividade de algumas enzimas, com consequente produção e acúmulo de compostos tipo fitoalexinas, proteínas, lignina e compostos fenólicos, conferindo resistência sistêmica de maneira inespecífica.

A resistência induzida representa atualmente uma ferramenta promissora no combate a importantes doenças do cacaueteiro como a vassoura-de-bruxa (Resende *et al.*, 2000) e a murcha-de-Verticillium (Cavalcanti, Resende e Andrade, 2000).

Na interação cacaueteiro x *V. dahliae*, Resende *et al.* (1996) identificaram quatro compostos tipo fitoalexinas em plantas da cultivar Pound-7, que apresenta certo nível de resistência ao patógeno. Esses compostos foram caracterizados como enxofre elementar e ácido arjunólico, mais tóxicos e ocorrendo com maior frequência, e ainda 3,4-dihidroxiacetofenona e 4-hidroxiacetofenona.

O aumento na atividade de enzimas oxidativas, como peroxidases (POs) e polifenoloxidasas (PPOs), tem sido geralmente correlacionado com alterações fisiológicas e estruturais, como síntese e acúmulo de lignina e formação de calose, e consequente aumento na expressão da resistência (Oliveira, Pascholati e Leite, 1997; Xue, Charest e Jabaji-Hare, 1998; Resende *et al.*, 2000). Reuveni *et al.* (1992) menciona que além de ser considerada como um importante pré-requisito para algumas respostas de defesa, a atividade de peroxidases deve ser utilizada como um marcador bioquímico antes da infecção por patógenos, auxiliando, desta maneira, na seleção de materiais resistentes em programas de melhoramento genético.

As polifenoloxidasas podem também representar um componente no processo de defesa, uma vez que são capazes de oxidar uma série de compostos fenólicos, dando origem a quinonas, que apresentam maior toxicidade a patógenos do que as formas reduzidas, como, por exemplo, compostos precursores da lignina (Lagrimini *et al.*, 1993; Nojosa, 1999).

Porém, não se sabe ao certo qual ou quais mecanismos de defesa são ativados no patossistema cacaueteiro x *V. dahliae* quando da utilização da resistência induzida. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi identificar a participação de fitoalexinas e do acúmulo de lignina e compostos fenólicos em plântulas de cacaueteiro contra *V. dahliae* no processo de resistência induzida por benzotiadiazole.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Foram utilizadas plântulas da cultivar Theobahia, germinadas em vermiculita e conduzidas em sacos de polietileno com substrato à base de areia, esterco e solo, na proporção 1:1:1. As mesmas foram adubadas aos 30 e 60 dias após a germinação com adubo NPK (4-14-8) e mantidas a uma temperatura média de 25° C e umidade relativa variando entre 50 e 80 % até o momento da coleta, 14 dias após a inoculação, quando foram cortadas rente ao solo, devidamente etiquetadas e armazenadas em recipiente com gelo para evitar a desnaturação das proteínas.

4.2 Aplicação do BTH

O benzotiadiazole (Bion®) foi aplicado aos 15 dias antes da inoculação do patógeno, via pulverização foliar, na dosagem de 20 g i. a./100 L de água, nas plântulas dos tratamentos BTH + *V. dahliae* (BTH + *Vd*) e apenas BTH (T_{BTH}). As plântulas pertencentes ao tratamentos testemunha (T_{ABS}) e apenas inoculadas com o fungo (T_{Vd}) foram pulverizadas com água destilada, em local afastado do local em que o BTH foi pulverizado, evitando, assim, qualquer possibilidade de contaminação destes tratamentos por deriva do produto pela ação do vento.

4.3 Preparo do inóculo e inoculação

O isolado de *V. dahliae*, proveniente de plantas de morangueiro (*Fragaria* sp.), foi cultivado em meio BDA durante 25 dias, em câmara de crescimento, a uma temperatura de aproximadamente 25° C, em regime de 12h claro / escuro. Após este período, efetuou-se a transferência de disco de meio de

cultura colonizado para placa de Petri contendo BDA. O inóculo foi preparado a partir de colônias com 25 dias de incubação, através da adição de 20 mL de água destilada, e posterior raspagem com auxílio de lâmina de vidro. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze, sendo ajustada em câmara de Neubauer para a concentração de 1×10^7 conídios/mL.

A inoculação foi realizada através do método de punção no caule, conforme descrito por Bugbee e Presley (1967), com auxílio de seringa plástica e agulha estéreis. A agulha foi inserida em um ângulo de 45° com o caule, até atingir o lenho da planta. Uma única gota da suspensão de inóculo (cerca de 10 μ l) teve acesso ao córtex, sendo rapidamente absorvida. As plantas controle foram, de maneira similar, injetadas com água destilada esterilizada.

4.4 Análises para detecção de fitoalexinas

4.4.1 Preparo e extração das amostras

Após o corte das plantas, retiraram-se as folhas e o córtex das mesmas com auxílio de estilete. Em seguida, realizou-se um corte longitudinal para a retirada da medula, sendo utilizada apenas a parte lenhosa dos caules. O material foi cortado em fragmentos de cerca de 0,5 cm, os quais foram secos em estufa ventilada a uma temperatura de 32° C, e triturados em moinho de aço inoxidável.

As amostras foram obtidas através do processamento de 40 g do material vegetal triturado em extrator Soxhlet, com éter etílico, por 10 ciclos, sendo posteriormente rotoevaporadas para a retirada do solvente.

4.4.2 Separação das substâncias

O fracionamento das amostras foi realizado em coluna de cromatografia "Flash" (2 cm de ϕ), com sílica gel, através da eluição com uma série de solventes orgânicos de polaridade crescente (Tabela 9A). As frações foram

coletadas em recipientes de vidro, sendo mantidas em câmara de exaustão para a evaporação dos solventes.

4.4.3 Monitoramento

Para a identificação da toxidez das frações sobre a germinação dos conídios de *V. dahliae*, realizou-se bioensaio em lâminas escavadas e aplicação em placas de TLC.

No bioensaio, 160 μL de cada fração foram colocados em cada cavidade da lâmina, sendo três repetições por fração. Após a completa evaporação do solvente, 25 μL de suspensão de conídios, em uma concentração de 1×10^6 conídios / mL de água, foram depositados em cada cavidade da lâmina. As lâminas foram mantidas sobre suportes de vidro, em câmara úmida, obtida em placas de Petri, contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada, durante 15 horas. Após este período, adicionaram-se 20 μL de corante azul de lactofenol a fim de cessar o processo de germinação dos conídios. O efeito fungitóxico das frações foi avaliado através da porcentagem de germinação dos conídios em comparação com as lâminas controle, apenas com água e suspensão de conídios.

Cada fração também foi aplicada sobre placas de TLC, sendo eluídas em uma mistura de solventes à base de éter etílico, hexano e metanol, na proporção 6:3:1. A revelação foi realizada através da pulverização de suspensão de conídios de *V. dahliae* (1×10^7 conídios/mL de água), diluída pela metade em meio de cultura líquido à base de sacarose e sais minerais (Cooper e Wood, 1975), e posterior incubação em câmara úmida, a uma temperatura de 25° C por 48 horas.

4.5 Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas

4.5.1 Preparo do material vegetal e extração das amostras

O procedimento para obtenção das amostras foi idêntico ao utilizado para a detecção de fitoalexinas, porém para a atividade de enzimas o material foi mantido desde o momento do corte até a leitura em espectrofotômetro, em baixas temperaturas (4 °C ou menos) para evitar a oxidação do material, e consequente degradação das enzimas a serem analisadas.

O extrato enzimático foi obtido através de maceração com pistilo, em almofariz de porcelana, de 0,2 g de material vegetal, na presença de nitrogênio líquido, adicionados a tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8 contendo EDTA 0,1 mM, em uma diluição de 1:25 (p/v). Após a maceração, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12000 rpm durante 20 minutos, a 4 °C. Cada amostra foi composta por quatro repetições. Em seguida, o sobrenadante foi coletado em pequenos tubos de plástico e armazenado em "deep freezer" a uma temperatura de -80 °C.

4.5.2 Determinação da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas

A atividade de peroxidases foi quantificada através da medida da absorbância da reação de oxidação do guaiacol, conforme metodologia descrita por Cortelazzo, Marais e Joseleau (1996), modificada. A mistura da reação consistiu de 40 mM de guaiacol e 20 mM de peróxido de hidrogênio em 40 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 6,7. Foram adicionados à mistura 100 µL da amostra diluída, resultando em um volume total de 2,5 mL.

Para a atividade de polifenoloxidasas utilizou-se a mesma metodologia para peroxidase, substituindo-se apenas o H₂O₂ por água ultrapurificada no meio da reação. As leituras foram realizadas contra um solução de mesma composição da mistura de reação para cada enzima, substituindo-se a alíquota da amostra por água e adicionando-se 500 µL de H₂SO₄ a 5% (v/v) a fim de evitar a ocorrência



de qualquer tipo de reação. As reações ocorreram em temperatura ambiente, em torno de 21° C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Beckman DU 640B a 470 nm, durante 01 minuto para peroxidases e 02 minutos para polifenoloxidasas, com acompanhamento em intervalos de 05 segundos, sendo os valores expressos em mudança na absorbância por grama de matéria fresca de amostra por minuto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura da porcentagem de germinação de conídios no bioensaio em lâminas escavadas para a detecção de fitoalexinas, não foram verificadas diferenças entre as subamostras obtidas das plantas pulverizadas com BTH + *V. dahliae* (BTH + *Vd*) e as testemunhas pulverizadas apenas com água (T_{ABS})(Tabela 1). O mesmo resultado ocorreu também nas placas de TLC, nas quais não se observou a formação de locais de inibição da germinação em nenhuma das subamostras extraídas de plantas pulverizadas com BTH e posteriormente inoculadas com o fungo, o que indica que, possivelmente, a produção e acúmulo de compostos tipo fitoalexinas não represente, nesta interação e nas condições e metodologia utilizadas neste estudo, uma resposta de defesa passível de indução através da aplicação de benzotriadiazole. Um fator que talvez tenha contribuído para a não detecção de fitoalexinas nas plantas tratadas com BTH + *V. dahliae* neste estudo foi o tamanho da amostra processada em extrator Soxhlet, constituída de apenas 40 g do material vegetal triturado. Neste mesmo patossistema, Resende *et al.* (1996) identificaram quatro tipos de fitoalexinas através da utilização de 570 g de material vegetal triturado e processado em Soxhlet.

Estudos com a aplicação de BTH em cultivares resistentes, nos quais produção de fitoalexinas represente uma resposta de defesa natural, são necessários para que, através da observação dos níveis destes compostos, possa-se concluir sobre a capacidade do BTH atuar na síntese de fitoalexinas. Ou seja, não se pode afirmar que o BTH não induza o acúmulo de fitoalexinas, uma vez que, para uma determinada resposta de defesa ser ativada, é necessário a expressão de genes que codificam para tal resposta de defesa, o que obviamente não ocorreria em plantas que não possuam tais genes de defesa.

TABELA 1 - Porcentagem de germinação de conídios de *Verticillium dahliae* em lâminas escavadas, contendo diferentes frações de material vegetal, eluídas em coluna de cromatografia "Flash"

Testemunha		BTH + <i>V. dahliae</i>	
Fração	% de germinação*	Fração	% de germinação
01	79,67	01	75,33
02	74,33	02	75,00
03	71,33	03	78,67
04	67,33	04	73,67
05	70,33	05	74,67
06	75,33	06	77,00
07	73,00	07	79,33
08	70,67	08	74,67
09	78,67	09	78,00
10	79,33	10	75,33
11	76,33	11	72,33
12	76,00	12	76,33
13	73,67	13	77,00
14	71,33	14	75,33
15	72,00	15	73,67
16	72,67	16	69,67
17	73,67	17	76,33
18	75,00	18	74,67
19	75,00	19	72,67
20	76,00	20	75,00
21	70,00	21	75,67
22	78,33	22	78,00

*Média de 03 repetições

Estes resultados levaram à consideração da possibilidade de estarem ocorrendo outros tipos de respostas de defesa, como síntese e acúmulo de lignina e formação de calose, como também a oxidação de quinonas a compostos de maior toxicidade ao fungo. Para verificar esta suposição, mediu-se a atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas, diretamente envolvidas nestas referidas respostas de defesas.

Através da leitura da absorbância a 470 nm em espectrofotômetro, constatou-se a maior atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas nas plantas que receberam a aplicação do BTH, em comparação com as plantas dos

tratamentos testemunha (T_{ABS}) e apenas inoculado com *V. dahliae* (T_{Vd}) (Figuras 1 e 2). Mediante a análise de regressão linear para a atividade de peroxidases nos diferentes tratamentos, observou-se a ocorrência de maior degradação do substrato no tratamentos BTH + *V. dahliae* (BTH + Vd) e apenas BTH em relação aos demais tratamentos, evidenciando a alta eficiência do benzotiadiazole em induzir a atividade desta enzima (Figura 3).

Para a atividade de polifenoloxidasas, a análise de regressão linear indica uma rápida elevação da atividade destas enzimas no tratamento BTH + *V. dahliae*, atingindo níveis próximos ao final da leitura da absorbância, ou seja, 02 minutos após o início da medida da atividade, daqueles observados na amostra referente às plantas somente pulverizadas com BTH (Figura 4).

Observa-se que o acréscimo na atividade de peroxidases nas plantas pulverizadas com BTH, em relação às plantas que apenas foram inoculadas com o fungo, além de ocorrer de forma mais rápida, se mantém em um nível mais alto por um período de tempo mais longo, uma vez que a coleta das plântulas foi realizada aos 14 dias após a inoculação do patógeno, se assemelhando ao que ocorre em uma interação incompatível (Flood, Moerschbacher e Reisener, 1997). Para um melhor entendimento do comportamento da atividade de peroxidases em plântulas tratadas e não tratadas com o BTH, seria necessário a realização de coletas do material vegetal em diferentes épocas após a inoculação do patógeno ("Time course"), de preferência mais precocemente, o que poderia fornecer informações sobre a velocidade de resposta na síntese destas enzimas, porém, devido a limitações no número de plântulas disponíveis, este estudo não foi realizado.

Mudanças na atividade de peroxidases devidas ao efeito do tratamento com algum tipo de elicitador já foram observadas em plantas de melão, tomate e algodão, entre outras, inclusive pela utilização de um elicitador purificado de *V. dahliae* (Smit e Dubery, 1997). Em cacauzeiro, também foram detectados

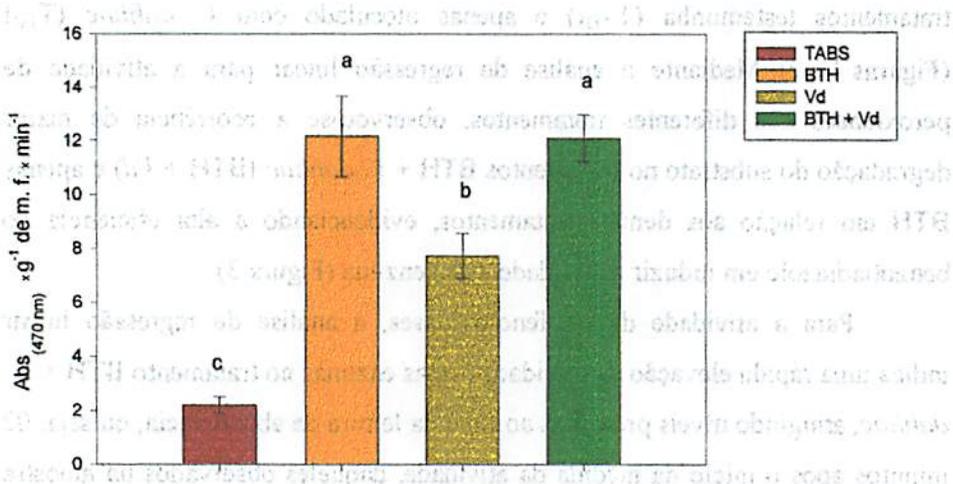


FIGURA 1 - Atividade de peroxidases em plântulas de cacauero, cv. Theobahia (Barras representam o desvio padrão; Letras distintas representam diferenças ao nível de 5%, pelo teste de Duncan)

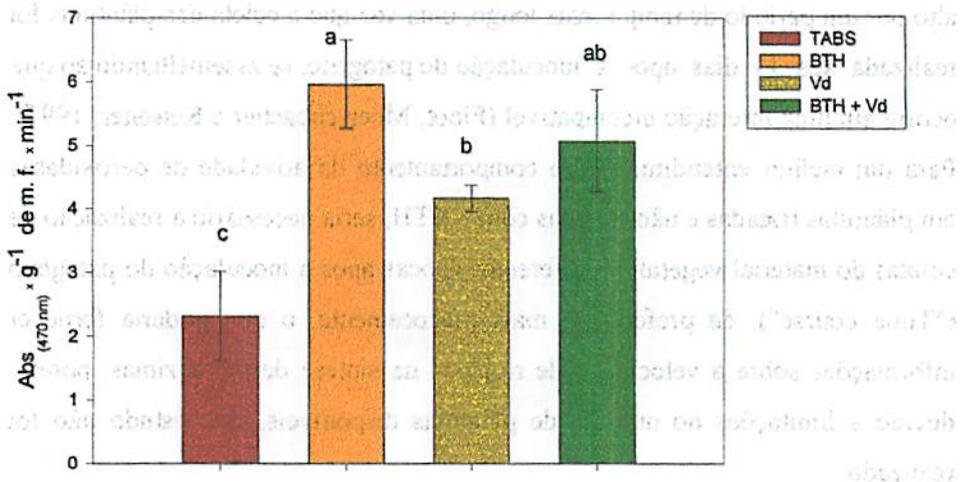


FIGURA 2 - Atividade de polifenoloxidases em plântulas de cacauero, cv. Theobahia (Barras representam o desvio padrão; Letras distintas representam diferenças ao nível de 5%, pelo teste de Duncan)

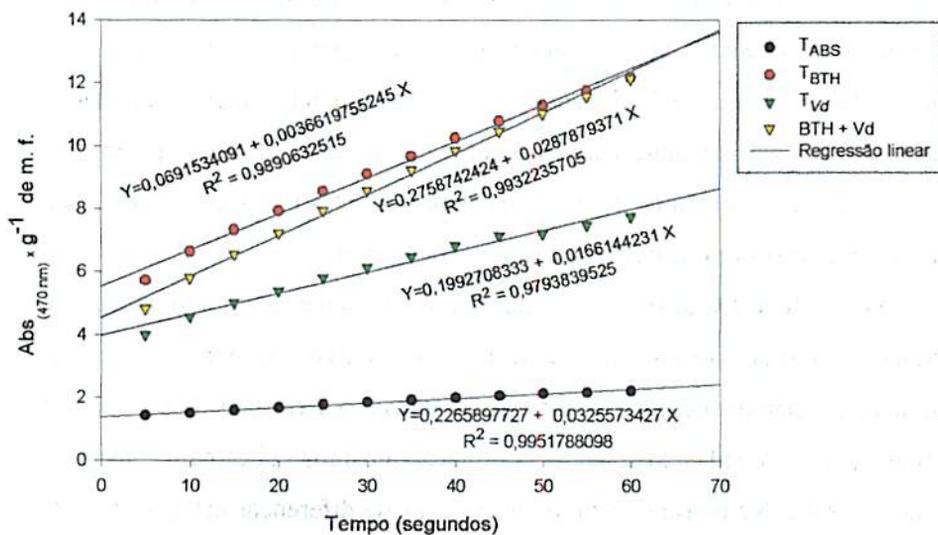


FIGURA 3 - Regressão linear da atividade de peroxidases em plântulas de cacauero cv. Theobahia

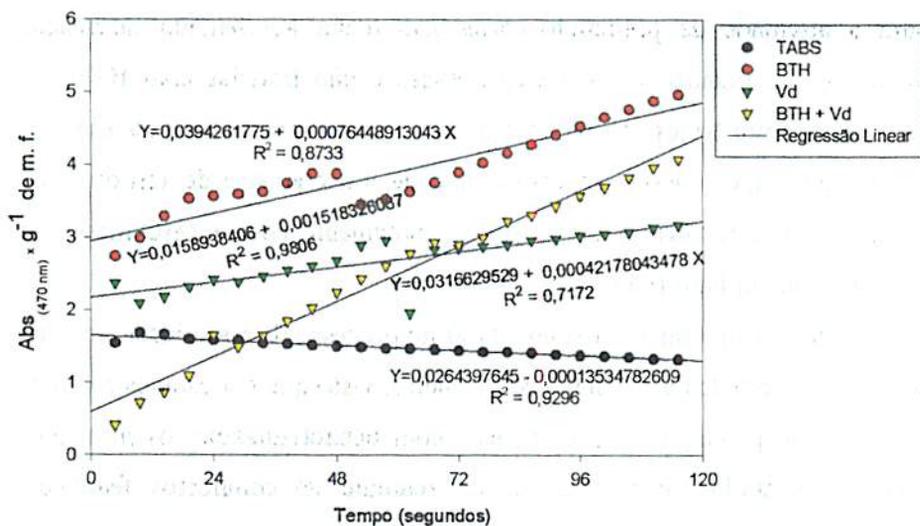


FIGURA 4 - Regressão linear da atividade de polifenoloxidasas em plântulas de cacauero cv. Theobahia

aumentos na atividade de peroxidases em plantas resistentes ou tratadas com indutores de resistência, em interações com *Phytophthora palmivora* e *C. pernicioso* (Okey *et al.*, 1997; Resende *et al.*, 2000). Os resultados apresentados por estes autores, em conjunto com os obtidos no presente estudo, indicam que, possivelmente, esta seja uma resposta de defesa generalizada em cacau, cuja expressão ocorre em interações com diversos patógenos.

As polifenoloxidasas representam um componente de uma série de respostas de defesa não só pela capacidade de inativar enzimas pectolíticas produzidas por patógenos, mas também por catalisar a oxidação de fenólicos a quinonas com elevada toxicidade a microrganismos (Leatham, King e Stahmann, 1980). No presente estudo, observaram-se diferenças estatisticamente significativas na atividade destas enzimas nas plantas tratadas com o BTH em comparação com às plantas testemunhas, o que reforça a idéia de que, no processo de resistência induzida por BTH deva ocorrer um conjunto de respostas de defesas, como, neste caso, o acúmulo de compostos fenólicos e lignina. Embora a atividade de polifenoloxidasas não tenha apresentado diferenças significativas em plantas de cacau tratado e não tratado com BTH em estudo realizado por Nojosa (1999), outros autores mostraram que essas enzimas podem ter um papel importante como parte de um conjunto de respostas de defesa em plantas resistentes de cacau, juntamente com a peroxidase e a fenilalanina amônia-liase (Okey *et al.*, 1997).

A participação das polifenoloxidasas no processo de resistência induzida merece maiores estudos em plantas de cacau, visto que em estudos recentes com plantas de pepino e tomate tratadas com benzotiadiazole, os principais mecanismos relatados constituíram-se de acúmulo de compostos fenólicos, resultando na expressão de resistência em plantas suscetíveis a *Pythium ultimum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, respectivamente (Benhamou e Bélanger, 1998 a;b).

Além disto, outros estudos, principalmente com a utilização de técnicas histopatológicas, devem ser realizados no intuito de ratificar os resultados obtidos no presente trabalho, através da detecção de estruturas morfológicas de defesa pós-infeccional, representadas principalmente pelo depósito de lignina e calose, entre a parede celular e a membrana plasmática das células vegetais.

As respostas de defesa envolvidas no processo de resistência induzida necessitam de estudos mais detalhados, inclusive sobre a atividade de enzimas hidrolíticas como quitinase e β -1,3-glucanase, e de enzimas relacionadas com a rota de fenilpropanóides, dentre elas a fenilalanina amônia liase e a chalcona sintetase, a fim de buscar um melhor entendimento das alterações fisiológicas ocorrentes nas plantas durante o processo de indução de resistência mediada pelo benzotiadiazole.

6 CONCLUSÕES

1. O aumento na atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas representa uma importante alteração fisiológica no processo de resistência induzida a *V. dahliae* em plântulas de cacauero pulverizadas com BTH.
2. A síntese e acúmulo de compostos fenólicos e lignina possivelmente são respostas efetivas no processo de defesa induzido por benzotiadiazole, em plântulas de cacauero a *V. dahliae*.
3. Não foi detectada a produção de fitoalexinas nas condições e metodologia utilizadas, podendo até mesmo ser que as mesmas não estejam envolvidas no processo de resistência induzida por BTH, tornando-se necessário mais estudos com uma maior quantidade de amostra.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, Dec. 1998a.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, p.13-21, 1998b.
- BUGBEE, W.M.; PRESLEY, T.J. A rapid inoculation technique to evaluate the resistance of cotton to *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, p.1264, 1967.
- CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V.; ANDRADE, G. C. G. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* por *Crinipellis pernicioso*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 23, 2000, Campinas. Anais do Campinas: GPF, 2000. p. 246.
- COOPER, R. M.; WOOD, R. K. S. Regulation of synthesis of cell-wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 5, p. 135-156, 1975.
- CORTELAZZO, A. L.; MARAIS, M.-F.; JOSELEAU, J.-P. Changes in peroxidases in the suspension culture of *Rubus fruticosus* during growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, the Hague, v. 46, p. 27-33, 1996.
- FLOOT, B. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; REISENER, H. J. Peroxidase isoenzymes patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. **New Phytologist**, London, v. 111, p. 413-421, 1997.
- LAGRIMINI, L. M.; VAUGHN, J.; ERB, W. A.; MILLER, S. A. Peroxidase overproduction in tomato: wound-induced polyphenol deposition and disease resistance. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, n. 3, p. 218-221, Mar. 1993.

- LEATHAM, G. F.; KING, M.; STAHMANN, M. A. *In vitro* protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungi oxidative enzymes. *Phytopathology*, St. Paul, v. 70, p. 1134-1140, 1980.
- NOJOSA, G. B. A. Participação de fenóis e enzimas oxidativas nos mecanismos bioquímicos de resistência constitutiva e induzida do cacauero (*Theobroma cacao* L.) à *Crinipellis pernicioso*. Brasília: UnB, 1999. 86p.(Dissertação de Mestrado).
- OKEY, E. N.; DUNCAN, E. J.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N. Phytophthora canker disease resistance in cacao: role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 145, p. 295-299, 1997.
- OLIVEIRA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 22, n. 2, p. 195-197, 1997.
- RESENDE, M. L. V.; FLOOD, J.; RAMSDEN, J. D.; ROWAN, M. G.; BEALE, M. H.; COOPER, R. M. Novel phytoalexins including elementhal sulphur in the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 48, 347-359, 1996.
- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis pernicioso*, através do benzotriazolozole (BTH). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.
- REUVENI, R.; SHIMONI, M.; KARCHI, Z.; KÚC, J. Peroxidase activity as a biochemical marker for resistance of muskmelon (*Cucumis melo*) to *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology*, St Paul, v. 82, p. 749-753, 1992.
- SMIT, F.; DUBERY, I. A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry*, Elmsford, v. 44, n. 5, p. 811-815, 1997.

XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAJI-HARE, S. H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, p. 359-365, 1998.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância da 1ª avaliação de índice de doença aos 30 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	79
TABELA 2A	Resumo da análise de variância da 2ª avaliação de índice de doença aos 45 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	79
TABELA 3A	Resumo da análise de variância da 3ª avaliação de índice de doença aos 60 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	80
TABELA 4A	Resumo da análise de variância do peso fresco das plântulas aos 60 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	80
TABELA 5A	Resumo da análise de variância da altura das plântulas aos 60 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	81
TABELA 6A	Resumo da análise de regressão linear de índice de doença aos 30 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	81
TABELA 7A	Resumo da análise de regressão polinomial de índice de doença aos 45 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	82
TABELA 8A	Resumo da análise de regressão linear da altura das plântulas aos 60 dias após a inoculação de <i>Verticillium dahliae</i>	82
TABELA 9A	Sequência de solventes utilizados na eluição das amostras provenientes de plântulas de cacauero em coluna de cromatografia "Flash".....	82

TABELA 1A - Quadro da análise de variância Variável Severidade 1ª Avaliação

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
BLOCOS	3	0,6284376	0,2094792	0,9894 NS
TRATAMENTOS	(8)	19,4519349	2,4314919	11,4838 **
TEST. vs. FATORIAL	1	5,4725343	5,4725343	25,8464 **
TEST1 vs. TEST2	1	6,8449999	6,8449999	32,3285 **
[TEST1 vs. TEST2] vs. TEST3	1	2,5480166	2,5480166	12,0341 **
DOSE	1	0,0737008	0,0737008	0,3480 NS
ÉPOCA	2	3,9757709	1,9878855	9,3886 **
DOSE x ÉPOCA	2	0,5369114	0,2684557	1,2679 NS
RESÍDUO	24	5,0815919	0,2117330	
TOTAL	35	25,16196		

MEDIA GERAL = 1,248056

CV = 36,869 %

TABELA 2A -Quadro da análise de variância Variável Severidade 2ª Avaliação

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
BLOCOS	3	0,1280628	0,0426876	0,2198 NS
TRATAMENTOS	(8)	25,8382031	3,2297754	16,6301 **
TEST. vs. FATORIAL	1	12,7596675	12,7596675	65,6997 **
TEST1 vs. TEST2	1	7,4498003	7,4498003	38,3591 **
[TEST1 vs. TEST2] vs. TEST3	1	4,0016666	4,0016666	20,6046 **
DOSE	1	0,0026016	0,0026016	0,1339 NS
ÉPOCA	2	0,4800305	0,2400152	1,2358 NS
DOSE x ÉPOCA	2	1,1444358	0,5722179	2,9464 NS
RESÍDUO	24	4,6610899	0,1942121	
TOTAL	35	30,62736		

MEDIA GERAL = 1,761111

CV = 25,024 %

TABELA 3A - Quadro da análise de variância Variável Severidade 3ª Avaliação

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
BLOCOS	3	0,2419779	0,0806593	0,4115 NS
TRATAMENTOS	(8)	28,5768529	3,5721066	18,2249 **
TEST. vs. FATORIAL	1	13,9304012	13,9304012	71,0731 **
TEST1 vs. TEST2	1	8,2621122	8,2621122	42,1534 **
[TEST1 vs. TEST2] vs. TEST3	1	4,3265042	4,3265042	22,0739 **
DOSE	1	0,0077020	0,0077020	0,0393 NS
ÉPOCA	2	0,5682562	0,2841281	1,4496 NS
DOSE x ÉPOCA	2	1,4502101	0,7251050	3,6994 *
RESÍDUO	24	4,7040249	0,1960010	
TOTAL	35	33,52286		

MEDIA GERAL = 1,833889

CV = 24,141 %

TABELA 4A - Quadro da análise de variância Variável Peso

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
BLOCOS	3	28,7460208	9,5820069	0,9543 NS
TRATAMENTOS	(8)	1262,2799438	157,7849930	15,7138 **
TEST. vs. FATORIAL	1	706,3787345	706,3787345	70,3483 **
TEST1 vs. TEST2	1	320,1714720	320,1714720	31,8859 **
[TEST1 vs. TEST2] vs. TEST3	1	188,2160204	188,2160204	18,7444 **
DOSE	1	0,5581168	0,5581168	0,0556 NS
ÉPOCA	2	25,4062915	12,7031457	1,2651 NS
DOSE x ÉPOCA	2	21,5493534	10,7746767	1,0730 NS
RESÍDUO	24	240,9879126	10,0411630	
TOTAL	35	1532,014		

MEDIA GERAL = 11,509722

CV = 27,531 %

TABELA 5A - Quadro da análise de variância Variável Altura

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
BLOCOS	3	39,8818410	13,2939470	0,8312 NS
TRATAMENTOS	(8)	1623,8766425	202,9845803	12,6914 **
TEST. vs. FATORIAL	1	619,0506374	619,0506374	38,7054 **
TEST1 vs. TEST2	1	489,0628602	489,0628602	30,5781 **
[TEST1 vs. TEST2] vs. TEST3	1	122,4468678	122,4468678	7,6559 *
DOSE	1	2,0532657	2,0532657	0,1284 NS
ÉPOCA	2	358,5234661	179,2617330	11,2081 **
DOSE x ÉPOCA	2	32,7398504	16,3699252	1,0235 NS
RESÍDUO	24	383,8533485	15,9938895	
TOTAL	35	2047,612		

MEDIA GERAL = 25,688055

CV = 15,568 %

TABELA 6A - Quadro da análise de Regressão Linear da variável Severidade 1ª avaliação

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
MODELO	1	3,97808	3,97808	18,7882 **
ÉPOCA	1	3,97808	3,97808	18,7882 **
DESVIOS DE REGRESSÃO	1	0,01288	0,01288	0,0608 NS
RESÍDUO	24	5,081592	0,2117330	
TOTAL	27	13,05063		

$R^2=0,99$

CV=2,63

TABELA 7A - Quadro da análise de Regressão Polinomial variável Severidade 3ª Avaliação

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
MODELO	(4)	1,68384	0,42096	2,147744 NS
DOSE LINEAR	1	0,008068	0,008068	0,041163 **
ÉPOCA LINEAR	1	0,080476	0,080476	0,41059 **
DOSE LINEAR ÉPOCA LINEAR	1	1,368076	1,368076	6,979944 **
DOSE LINEAR ÉPOCA QUAD.	1	0,227212	0,227212	1,159239 NS
DESVIOS DE REGRESSÃO	1	0,36212	0,36212	1,847542 NS
RESÍDUO	24	4,704025	0,196001	
TOTAL	29	6,7499		

$R^2=0,82$

CV=

TABELA 8A - Quadro da análise de variância Variável Altura Regressão Linear

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F
MODELO	1	340,49496	340,49496	21,2890 **
ÉPOCA	1	340,494936	340,494936	21,2890 **
DESVIOS DE REG.	1	17,92	17,92	1,1204 NS
RESÍDUO	24	383,8533485	15,9938895	
TOTAL	27	1082,763		

$R^2=0,95$

CV=6,58

TABELA 9A - Sequência de solventes utilizados na eluição das amostras provenientes de plântulas de cacauero em coluna de cromatografia "Flash"

Solventes	Quantidade (mL)	Proporção
Hexano	30	-
Éter : Hexano : Metanol	100	6:3:1
Éter : Metanol	60	2:1
Metanol	70	-