

58335
049854

ALESSANDRA KEIKO NAKASONE ISHIDA

**RESISTÊNCIA INDUZIDA POR RIZOBACTÉRIAS E
ACIBENZOLAR-S-METIL (ASM) NO CONTROLE DA MANCHA
ANGULAR (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) DO
ALGODOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

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

Ishida, Alessandra Keiko Nakasone

Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro / Alessandra Keiko Nakasone Ishida. – Lavras : UFLA, 2004.

130 p. : il.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Algodão. 2. Doença. 3. Controle. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.51932

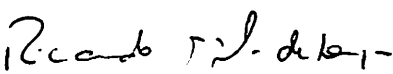
ALESSANDRA KEIKO NAKASONE ISHIDA

**RESISTÊNCIA INDUZIDA POR RIZOBACTÉRIAS E
ACIBENZOLAR-S-METIL (ASM) NO CONTROLE DA MANCHA
ANGULAR (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) DO
ALGODOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 22 de abril de 2004.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Prof. Dr. Vicente Paulo Campos	UFLA
Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho	UFLA
Profa. Dra. Andréa Bittencourt Moura	UFPEL


Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Renato e Suduco,
aos irmãos, Tânia, Evandro e
Fábio, e aos demais familiares
pelo apoio e confiança,

OFEREÇO

Ao Emílio, companheiro de todas
as horas, e à nossa filha Ana
Carolina, a alegria nos momentos
difíceis

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro concedido para a realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio e financiamento deste trabalho.

Ao professor Ricardo Magela de Souza pela amizade, orientação e dedicação dispensada durante a realização deste trabalho.

Aos professores Mário Lúcio Vilela de Resende e Edson Ampélio Pozza pela orientação e apoio.

Aos professores Vicente Paulo Campos, Dulcinéia de Carvalho e Andréa Bittencourt Moura pelas sugestões e participação na Banca Examinadora.

A Dili Luíza de Oliveira, que desde o início auxiliou na condução deste trabalho.

Ao Laboratório de Bacteriologia, Ana Maria, Ana Beatriz, Juliana Barbosa, Juliana Campos, Nilvanira, Patrícia e Theo, pela amizade, convivência e auxílio.

Ao Laboratório de Virologia, Professora Antônia, Rita, Evando, Vanússia e Ellen, pela amizade, convivência e intercâmbio de materiais e equipamentos.

Ao Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Pedro, Daniel, Carla Galeno, Ricardo, em especial ao Fábio, pela amizade e auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

À Dra. Leimi Kobayashi, da Universidade Federal de Cuiabá, e a Msc. Andréa Quixabeira, da UNIVAG-MT, pelo envio de amostras de folhas e raízes de algodão.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Chitarra, da Embrapa Algodão, pelo envio de sementes e amostras de raízes de algodão.

Aos colegas de curso, Flávio, Frederico, Silvinha, Zuleide, Miriam, Igor, Florisvalda, Deila, Carlos e Anderson.

Aos Doutores Jane Perez Oliveira, Viviane Talamini, João Coimbra, Gutembergue Barone Nojosa, Hércules Diniz Campos, Edin Orozco, Sônia Lima Salgado e Cacilda M. Duarte Rios Faria pela amizade e bons momentos vividos durante o curso.

A Di Lurdes, Eloísa, Rute, Renata, Carzinho, Ângela, Antônio Carlos, Denise, Sidnei e Leísa pela amizade e boa vontade sempre demonstradas.

A Silene Paulo, que com carinho e dedicação, cuidou de minha filha Ana Carolina para que este trabalho pudesse ser realizado.

E a todas as demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização do curso.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Resumo	i
Abstract	iii
Capítulo 1: Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>) do algodoeiro	1
1 Introdução Geral	2
2 Revisão de Literatura	5
2.1 Mancha Angular do Algodoeiro	5
2.2 Indução de Resistência	6
2.2.1 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)	9
2.2.2 Resistência Sistêmica Induzida (ISR) por Rizobactérias	14
3 Referências Bibliográficas	21
Capítulo 2: Indução de Resistência Sistêmica mediada por rizobactérias em algodão contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	28
1 Resumo	29
2 Abstract	30
3 Introdução	31
4 Material e Métodos	33
4.1 Origem, isolamento e preservação do patógeno	33
4.2 Isolamento e preservação de rizobactérias	33
4.3 Seleção de rizobactérias com potencial para controlar a mancha angular do algodoeiro em condições de casa-de-vegetação	34
4.4 Efeito <i>in vitro</i> de rizobactérias sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (detecção de antibiose)	36
4.5 Caracterização parcial dos isolados de rizobactérias	36
4.5.1 Reação de Gram	37
4.5.2 Relação com o oxigênio livre (Anaerobiose)	37

4.5.3 Catalase	37
4.5.4 Teste para a produção de pigmento fluorescente	39
4.6 Efeito da época de aplicação e concentrações dos isolados de rizobactérias sobre a resistência induzida	39
5 Resultados e Discussão	40
5.1 Isolamento e seleção de rizobactérias com potencial para controlar a mancha angular do algodoeiro em condições de casa-de-vegetação	40
5.2 Efeito <i>in vitro</i> de rizobactérias sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (detecção de antibiose)	45
5.3 Caracterização parcial dos isolados de rizobactérias	45
5.4 Efeito da época de aplicação e concentrações dos isolados de rizobactérias sobre a resistência induzida	46
6 Conclusões	49
7 Referências Bibliográficas	50
Capítulo 3: Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular do algodoeiro	53
1 Resumo	54
2 Abstract	55
3 Introdução	56
4 Material e Métodos	58
4.1 Efeito <i>in vitro</i> de ASM sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	58
4.2 Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação do ASM sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação	58
4.3 Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha angular do algodoeiro	59
5 Resultados e Discussão	61
5.1 Efeito <i>in vitro</i> de ASM sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	61

5.2 Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação do ASM sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação	62
5.3 Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha angular do algodoeiro	63
6 Conclusões	65
7 Referências Bibliográficas	66
Capítulo 4: Atividade das enzimas fenilalanina amônia liases, β-1,3-glucanases e peroxidases e deposição de lignina em plantas de algodão tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e uma rizobactéria do algodoeiro e desafiadas contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	69
1 Resumo	70
2 Abstract	71
3 Introdução	72
4 Material e Métodos	74
4.1 Origem, isolamento e preservação do patógeno	74
4.2 Origem e preservação do isolado de rizobactéria	74
4.3 Efeito do ASM e rizobactérias sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação	75
4.4 Atividade das enzimas envolvidas nas respostas de defesa de plantas de algodão	76
4.4.1 Preparo das amostras para determinação das atividades das enzimas fenilalanina amônia liase e β -1,3 glucanase	77
4.4.2 Determinação de proteínas totais	77
4.4.3 Ensaio enzimáticos	78
4.4.3.1 Fenilalanina amônia-liase (PAL) (EC. 4.3.1.5) ...	78
4.4.3.2 β -1,3 glucanase (EC. 3.2.1.6)	78
4.4.3.3 Peroxidases (POX) (EC. 1.11.1.7)	79
4.4.4 Lignina	80
5 Resultados e Discussão	82

5.1 Efeito do ASM e rizobactérias sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação	82
5.2 Determinação de proteínas solúveis totais	83
5.3 Atividade das enzimas envolvidas nas respostas de defesa de plantas de algodão	87
5.3.1 Fenilalanina amônia liase (PAL)	87
5.3.2 β -1,3-Glucanase	91
5.3.3 Peroxidases (POX)	95
5.4 Determinação de lignina	101
6 Conclusões	104
7 Referências Bibliográficas	105
Capítulo 5: Efeito comparativo do acibenzolar-S-metil (ASM) com fungicidas e antibiótico no controle da mancha angular do algodoeiro	110
1 Resumo	111
2 Abstract	112
3 Introdução	113
4 Material e Métodos	116
4.1 Origem, isolamento e preservação do patógeno	116
4.2 Efeito <i>in vitro</i> de produtos químicos sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	116
4.3 Efeito de diferentes produtos químicos no controle da mancha angular do algodoeiro	117
4.4 Efeito de diferentes produtos químicos no controle da mancha angular do algodoeiro em 3 aplicações	118
5 Resultados e Discussão	120
5.1 Efeito <i>in vitro</i> de produtos químicos sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	120
5.2 Efeito de diferentes produtos químicos no controle da mancha angular do algodoeiro	121

5.3 Efeito de diferentes produtos químicos no controle da mancha angular do algodoeiro em 3 aplicações	123
6 Conclusões	125
7 Referências Bibliográficas	126

RESUMO

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro. 2004. 130p. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A mancha angular do algodoeiro tem ocorrido nas principais regiões produtoras, principalmente em áreas irrigadas e em regiões com alta precipitação, sendo uma bacteriose de difícil controle. A utilização da resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) tem sido promissora no controle de várias bacterioses. O presente trabalho teve como objetivo selecionar e avaliar o efeito de rizobactérias e do ASM no controle da mancha angular do algodoeiro, bem como identificar os possíveis mecanismos enzimáticos envolvidos na indução de resistência em algodão a *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. Foram selecionados quatro isolados (MT1-12, MT4-8, MT7-10 e L2-1) de rizobactérias com potencial em reduzir a severidade da mancha angular do algodoeiro, os quais não apresentaram *in vitro* efeito inibitório direto a *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. Quanto ao ASM, não houve diferença significativa entre as épocas de aplicação. O ASM foi mais eficiente no controle da mancha angular quando aplicado uma única vez, aos 7 dias antes da inoculação do patógeno, na dosagem de 10,0 i.a./100L água, do que quando aplicado em 3 pulverizações com intervalo de 14 dias. Quando se compararam o efeito do isolado rizobacteriano L2-1 e do ASM isoladamente e o uso simultâneo destes dois indutores na redução dos sintomas da mancha angular do algodoeiro, verificou-se que o acibenzolar-S-metil e o isolado L2-1, utilizados isoladamente ou simultaneamente, reduziram significativamente a severidade da mancha angular do algodoeiro, sendo que o melhor tratamento para o controle da mancha angular foi proporcionado pelo acibenzolar-S-metil. Não houve efeito aditivo quando se utilizou o acibenzolar-S-metil simultaneamente com o isolado L2-1. Os resultados das atividades enzimáticas em plantas de algodão revelaram que o ASM proporcionou os maiores aumentos nas atividades de PAL, peroxidases, β -1,3-glucanases e na deposição de lignina, sendo que as maiores atividades de PAL, peroxidases e β -1,3-glucanases ocorreram aos 14 dias após aplicação dos tratamentos. Quanto à aplicação simultânea do ASM com a rizobactéria, a atividade das enzimas foi sempre inferior ao tratamento em que o ASM foi aplicado isoladamente. Em outro experimento, a eficiência do ASM foi comparada aos produtos kasugamicina, oxicloreto de cobre e cloreto de benzalcônio no controle da mancha angular do algodoeiro. O ASM

proporcionou as maiores reduções na severidade da doença. As plantas tratadas com oxiclóreto de cobre e kasugamicina não diferiram significativamente da testemunha.

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

ABSTRACT

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Induction of systemic resistance by rhizobacteria and acibenzolar-S-methyl (ASM) to control cotton bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*). 2004. 130p. Thesis (Doctorate in Agronomy - Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The cotton bacterial blight is an important disease mainly in humid areas and its control has been very difficult so far. The use of induced resistance is a promising measure to control several bacterial diseases. The present work was aimed at selecting rhizobacteria and assessing the effect of those and of ASM to protect cotton against bacterial blight. The possible enzymatic mechanisms involved on the induction of resistance in cotton against *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* were also evaluated. Four rhizobacteria strains (MT1-12, MT4-8, MT7-10 and L2-1) were selected with potential to reduce the bacterial blight severity, which did not show any *in vitro* antimicrobial activity against *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. There was no significant difference among application times of ASM. ASM was more efficient to control bacterial blight at one application, 7 days before the pathogen inoculation, at the dosage of 10.0 g a.i./100L, than at 3 sprays with interval of 14 days. When the effect of L2-1 strain and ASM were compared, separately and simultaneously, the use of both reduced significantly the cotton bacterial blight symptoms, and the best treatment for bacterial blight control was provided by ASM. There was no additive effect when ASM was used simultaneously with L2-1. The results of enzymatic activities in cotton plants revealed that ASM provided the highest increase in the activities of PAL, peroxidases, β -1,3-glucanases and in lignin deposition, after 14 days of the treatment application. When ASM and rhizobacteria were applied simultaneously, enzyme activities were always lower than those of ASM applied separately. In another experiment, the efficacy of ASM was compared with the products kasugamicin, copper oxychloride, and benzalkonium chloride. The treated plants with copper oxychloride and kasugamicin did not differ significantly from the control and ASM has provided the highest reductions in disease severity.

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

CAPÍTULO 1

Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro

1 INTRODUÇÃO GERAL

O plantio de algodão em pequenas áreas e a falta de tecnologia perderam espaço na cotonicultura brasileira atual, criando-se um novo modelo produtivo, com a utilização de altas tecnologias, investimento em qualidade de fibra e o plantio em extensas áreas (Agrianual, 2000). Em adição, o crescimento das indústrias têxteis tem intensificado a importância desta cultura no país (Beltrão, 1999). Dentro desta alta tecnologia podem ser citadas as profundas modernizações nas práticas culturais, como a implantação da colheita mecanizada; a maior utilização de reguladores de crescimento e o uso do sistema de plantio direto. Acompanhando toda esta revolução tecnológica, novas doenças, e até mesmo aquelas já conhecidas e que não eram prejudiciais no passado, manifestam-se, trazendo grandes desafios à produção (Penna, 2000).

A mancha angular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) (Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995) (= *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*), tem se tornado uma importante doença nas principais regiões produtoras, principalmente em áreas irrigadas e em regiões com alta precipitação na época de desenvolvimento da cultura, já que chuvas acompanhadas de fortes ventos e altas temperaturas são fatores importantes para o desenvolvimento de epidemias e têm grande influência na manifestação dos sintomas, até mesmo em variedades resistentes (Cia e Salgado, 1997). O principal meio de disseminação desta bactéria são as sementes contaminadas, que a carregam tanto externa quanto internamente. Têm-se encontrado até 20% de sementes infectadas em lotes comerciais, sendo que a bactéria pode permanecer viável dentro delas por até 56 meses e o inóculo interno, geralmente, não é eliminado após o deslintamento ácido (Mohan, 1983; Cia e Salgado, 1997).

Como medidas de controle desta bacteriose podem ser citadas o uso de sementes sadias, através da produção de sementes certificadas; o controle químico com antibióticos e produtos à base de cobre e o uso de variedades resistentes. No entanto, para a produção de sementes certificadas é necessário contar com métodos específicos, sensíveis e de fácil execução para a detecção de bactérias em sementes, os quais não estão disponíveis atualmente. Resultados não muito promissores e o aparecimento de populações resistentes a antibióticos têm inviabilizado o uso do controle químico. A quebra da resistência de variedades tem sido freqüente nas grandes áreas produtoras. Todos estes fatores têm tornado difícil o controle desta bacteriose, preocupando pesquisadores e produtores.

Os trabalhos com resistência induzida desde a década passada têm levado a uma extraordinária consciência do papel essencial desempenhado por alguns agentes microbianos, produtos naturais e químicos em estimular a expressão dos genes de defesa e a resistência a doenças em plantas. Vários exemplos na literatura têm demonstrado que é possível o controle de bacterioses empregando rizobactérias e produtos químicos indutores de resistência (Friedrich *et al.*, 1996; van Wees *et al.*, 2000; Venâncio *et al.*, 2000; van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Pieterse *et al.*, 2000; Zehnder *et al.*, 2000; 2001; Romero, Kousik e Ritchie, 2001; Bausal, Soyly e Soyly, 2003; Silva *et al.*, 2003a; 2003b).

O entendimento da regulação genética da resistência induzida é importante para determinar como as plantas são capazes de traduzir os sinais gerados durante a infecção que a levam à expressão de supostos genes de defesa e à habilidade para armar a resistência efetiva contra uma ampla gama de patógenos (Hammerschmidt, 1999). Os recentes avanços na biologia molecular e na transformação de plantas fornecem evidências de que uma planta sensibilizada responde mais rapidamente à infecção, podendo conferir um

aumento na proteção contra patógenos virulentos (Pieterse *et al.*, 1996; 1998; 2000).

Diante dos desafios enfrentados pelos cotonicultores, torna-se necessário o estudo de novas alternativas de controle da mancha angular, mediante o uso de indutores de resistência bióticos e abióticos, bem como do modo como a resistência é induzida na planta.

O presente trabalho teve como objetivos selecionar isolados de rizobactérias capazes de induzir resistência sistêmica a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em algodão; avaliar o efeito do ASM na indução de resistência a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em algodão; avaliar o efeito de rizobactérias e do ASM na indução de resistência a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em algodão; bem como—identificar os possíveis mecanismos enzimáticos envolvidos na indução de resistência em algodão a *X. axonopodis* pv. *malvacearum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mancha Angular do Algodoeiro

No Brasil, o primeiro relato da mancha angular do algodoeiro foi feito por Hempel, em 1927, com referência a uma doença causada por uma espécie de bactéria que se desenvolvia nas células interiores das folhas, invadindo também o capulho (Chievegato, 1988). A mancha angular é causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) (Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995), uma bactéria gram-negativa que se movimenta por apenas um flagelo polar (Watkins, 1981). Em meio de cultura, as colônias são lisas e de coloração amarela (Watkins, 1981).

Os sintomas provocados pelo patógeno ocorrem principalmente nas folhas, na forma de lesões angulosas, e nas maçãs, podendo, ainda, em condições especiais, incidir nos pecíolos, pedúnculos e hastes principais da planta (Cia *et al.*, 1976; Cia, 1977). Nas maçãs, as lesões provocadas pela bactéria são geralmente invadidas por fungos causadores de podridões, principalmente por *Colletotrichum gossypii*, o qual é isolado mais freqüentemente destas lesões, contribuindo, com esta associação, para a completa destruição do produto final (Balmer, Cruz e Silveira, 1967).

Muito influenciada pelas condições de ambiente, a doença pode ocorrer com maior ou menor severidade todos os anos (Cruz *et al.*, 1965; Cia *et al.*, 1976; Cia, 1977). Contudo, para o desenvolvimento de epidemias, além da alta umidade e ventô, regimes com temperatura noturna baixa e diurna alta favorecem a manifestação de sintomas até mesmo em variedades consideradas geneticamente mais resistentes (Cia e Salgado, 1997).

O controle desta bacteriose tem sido feito principalmente através do uso de variedades resistentes. Porém, devido à complexidade de fatores ambientais,

além de pragas, doenças e de várias exigências na condução desta cultura, pode-se afirmar que não existe, e provavelmente nunca existirá, a cultivar perfeita de algodão. Os ambientes de cultivo são inúmeros e estão em constante mudança devido às interações que ocorrem entre clima, solo, incidência de doenças e pragas, entre outros fatores (Penna, 2000).

Deste modo, uma alternativa a ser utilizada dentro do programa de controle de doenças é a utilização da resistência induzida, a qual pode atuar como uma medida adicional no manejo integrado da mancha angular do algodoeiro.

2.2 Indução de resistência

A resistência natural de plantas a patógenos é baseada nos efeitos combinados de barreiras pré-formadas e mecanismos induzidos (Mauch-Mani e Métraux, 1998; van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Métraux, 2001). O efeito das barreiras constitutivas já presentes na planta antes do ataque do patógeno é referido como resistência constitutiva (Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997). A resistência induzida é definida como um aumento da capacidade defensiva da planta contra um amplo espectro de patógenos e pragas, adquirida após um estímulo apropriado (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Knoester *et al.*, 1999; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Em ambos os casos, as plantas usam defesas físicas e antimicrobianas contra os invasores. Em contraste com a resistência constitutiva, a resistência induzida baseia-se no reconhecimento de um invasor e subseqüentes eventos de transdução de sinal que levam à ativação das defesas (Mauch-Mani e Métraux, 1998).

A resistência induzida pode ser ativada por certos químicos, não patógenos, formas avirulentas de patógenos, raças incompatíveis de patógenos, ou por patógenos virulentos em circunstâncias em que a infecção é retardada

devido às condições do ambiente (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Geralmente é caracterizada por uma redução no tamanho e/ou número de lesões desenvolvidas após a inoculação da planta induzida com formas virulentas do patógeno e, algumas vezes, avirulentas indutoras da resposta de hipersensibilidade (HR) (Hammerschmidt, 1999). Esta resistência é expressa localmente no sítio de ataque do patógeno e sistemicamente, em partes da planta não infectadas (Mauch-Mani e Métraux, 1998). Os mecanismos de defesa envolvidos incluem uma combinação de mudanças físicas tais como lignificação da parede celular, formação de papilas ou indução de várias proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) (Kessmann *et al.*, 1994; van Loon, 1997).

A lignificação pode contribuir com a resistência de diferentes maneiras. A incorporação da lignina na parede celular vegetal está ligada ao seu fortalecimento mecânico, fazendo-a mais resistente à degradação por enzimas secretadas por um patógeno invasor. Paredes celulares lignificadas também podem constituir uma barreira, evitando o movimento livre de nutrientes. Os precursores de lignina podem exercer efeito tóxico sobre os patógenos ou, por ligar-se à parede celular de fungos, fazendo-a mais rígida e impermeável, impedir o futuro crescimento ou movimento de água e nutrientes (Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997).

A lignina é formada pela polimerização dehidrogenativa casualizada de precursores produzidos na via dos fenilpropanóides (Vance, Kirk e Sherwood, 1980). O primeiro passo nesta via é a deaminação da fenilalanina a ácido cinâmico catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL). A PAL envolve precursores para a lignina e para vários metabólitos secundários da planta, derivados da via dos fenilpropanóides envolvidos na resistência, como fitoalexinas e ácido salicílico (AS) (Ward *et al.*, 1991). PAL é induzida em muitas reações de resistência e após tratamento com vários elicitores de reações

de defesa. Outras enzimas da rota dos fenilpropanóides, como por exemplo, cinamil álcool desidrogenase, 4-cumarato:CoA ligase e peroxidases, são também induzidas em reações de resistência (Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997). Estas alterações na estrutura da parede celular vegetal após a infecção podem contribuir com a resistência, ou por parar o ingresso do patógeno diretamente ou por retardar o processo de penetração, permitindo então à planta ativar mecanismos de defesa adicionais, como a expressão de genes que codificam PR proteínas.

As PR proteínas acumulam-se abundantemente no local de infecção, mas algumas acumulam-se também nas partes não inoculadas da planta, embora em menor grau. Várias PR proteínas, incluindo PR1, β -1,3-glucanases (PR-2), quitinases (PR3), PR-4 e osmotina (PR-5), apresentam atividades antimicrobianas *in vitro* (Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997). Há dois papéis mecanísticos óbvios que as PR proteínas podem ter na resistência induzida. O primeiro é bloquear diretamente o desenvolvimento de fungos, oomicetos e bactérias patogênicas via ação hidrolítica nas paredes celulares do patógeno ou por outra atividade antimicrobiana (van Loon, 1997). A atividade enzimática das glucanases e quitinases pode também ajudar indiretamente na resistência através da liberação de elicitores não específicos (van Loon, 1997).

A resistência induzida a patógenos pode ser subdividida em duas amplas categorias. A indução da resistência sistêmica por rizobactérias é referida como resistência sistêmica induzida (ISR) e, quando a indução ocorre por outros agentes, é chamada de resistência sistêmica adquirida (SAR) (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998).

2.2.1 Resistência sistêmica adquirida (SAR)

A resistência sistêmica adquirida (SAR) refere-se a uma distinta via de transdução de sinal com importante papel na defesa de plantas contra patógenos. Após a formação de uma lesão necrótica, como parte da HR ou como um sintoma da doença, a via SAR é ativada (Ryals *et al.*, 1996).

O estado de SAR induzido por patógeno é caracterizado pela proteção contra ampla gama de patógenos, aumento inicial no ácido salicílico (AS) sintetizado endogenamente e concomitante ativação de genes codificadores de PR proteínas (Ryals *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 1996; van Loon, 1997; Oostendorp *et al.*, 2001), as quais são frequentemente usadas como marcadores para o estado induzido (Knoester *et al.*, 1999).

A rota de sinalização que controla SAR induzida por patógeno tem sido bem estudada em *Arabidopsis*. Como em muitas outras espécies, SAR induzida por patógeno em *Arabidopsis* é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está firmemente correlacionada com a ativação de genes PR (Pieterse *et al.*, 2001). Plantas transformadas com o gene *nahG* não acumulam AS ou PR proteínas e não desenvolvem SAR em resposta a patógenos necrotróficos. O gene *nahG* codifica salicilato hidroxilase, que converte AS em catecol, um produto não indutor de resistência. Experimentos com plantas transgênicas *nahG* indicam que AS é uma molécula sinalizadora essencial em SAR induzida por patógenos necrotróficos (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Pieterse *et al.*, 2001). Análise de mutantes de *Arabidopsis* afetados em sua resposta ao ácido jasmônico (AJ) ou etileno desenvolvem níveis normais de SAR induzida por patógenos, indicando que a rota de SAR funciona independentemente das respostas de defesa dependentes de AJ e etileno (Pieterse *et al.*, 2001).

Um importante evento para a expressão de SAR é a produção de um sinal sistêmico. Claramente, o sinal sistêmico para SAR é o resultado de reações

ocorridas na folha primária após a primeira inoculação, mas sua natureza química permanece incerta. Foi levantada a possibilidade de que este sinal fosse o AS, devido a sua importância pelas correlações entre o tempo de acúmulo de AS e a sua concentração endógena em relação à aparência da resistência na folha superior. No entanto, duas linhas de evidência sugerem que o AS não é o sinal de longa distância (Ryals *et al.*, 1996). Primeiro, em pepino, as folhas primárias infectadas com *P. syringae* podem ser removidas até 6 h após a inoculação, portanto antes do acúmulo de AS no floema, sem afetar o aumento sistêmico de AS ou a expressão do gene SAR (Rasmussen, Hammerschmidt e Zook, 1991). Segundo, em plantas enxertadas de fumo, a inoculação de TMV em porta-enxertos NahG resultou em acúmulo muito pequeno em tecido infectado, comparado com um aumento de 185 vezes para plantas tipo selvagem (Xanthi). Entretanto, a transmissão do sinal sistêmico para fora dos porta-enxertos NahG pareceu não ser afetada porque os enxertos tipo selvagens tinham elevados níveis de expressão do gene SAR e a resistência induzida equivalente àquela vista em plantas tipo selvagem não enxertadas (Vernooij *et al.*, 1994). Então, a localização e o posicionamento do sinal sistêmico primário na rota sistêmica permanece desconhecido (Métraux, 2001).

Além de ser considerado um sinal secundário necessário para a via de transdução de sinal de SAR, o AS pode ter diferentes efeitos antimicrobianos, podendo também atuar como inibidor de um passo na biossíntese de AJ, um composto envolvido na expressão de genes induzidos por ferimento. Entretanto, não se sabe se estas ações são de relevância direta para SAR. AS pode ser fitotóxico, mas quando aplicado exogenamente em nível ótimo, pode induzir SAR sem formação de lesões (Sticher, Mauch-Mani e Métraux, 1997).

Além do AS, vários químicos têm sido descobertos e parecem atuar em vários pontos nas vias de ativação de defesa de plantas e imitam parte ou toda ativação biológica de resistência. Dentre as moléculas indutoras de resistência,

encontram-se, o probenazole (PBZ), o ácido 2,6-dicloroisonicotínico, o ácido 2,6-dicloroisonicotínico metil éster (INA), o 1,2-benzisotiazol-3(2H)-one 1,1-dióxido (BIT), o benzo (1,2,3) tiadiazole-7 ácido carbotióico S-metil éster (acibenzolar-S-metil - ASM) e outros. Destes, apenas poucos atingiram a comercialização (Oostendorp *et al.*, 2001). Estes químicos não apresentam qualquer atividade antimicrobiana *in vitro* e ativam resistência contra o mesmo espectro de patógenos como os indutores biológicos de SAR nas espécies de plantas em que esta informação é disponível. Ao nível molecular, estes químicos induzem o mesmo grupo de genes SAR, característico da indução biológica ou por AS (Friedrich *et al.*, 1996).

O ASM é o ativador de resistência melhor estudado e o primeiro produto comercial sob os nomes de BION®, ACTIGARD™ e BOOST® (Venâncio *et al.*, 2000). Em monocotiledôneas, a resistência ativada por ASM é tipicamente muito duradoura, mas esse efeito em dicotiledôneas é menos pronunciado (Oostendorp *et al.*, 2001). ASM é translocado sistemicamente em plantas e pode imitar o AS na via de sinalização natural de SAR, induzindo o mesmo espectro de resistência e o mesmo grupo de marcadores moleculares (Oostendorp *et al.*, 2001).

O ASM é recomendado para indução de resistência em uma série de doenças fúngicas em trigo, sendo também usado como tratamento protetor nos estágios iniciais de progresso de doenças. Estudos com o produto encontram-se em desenvolvimento para uma ampla faixa de doenças nas culturas de arroz, banana, olerícolas e fumo (Venâncio *et al.*, 2000). No Brasil, esta molécula vem sendo testada em cacau, tomate, citros, café, feijão, algodão e em outras culturas, apresentando resultados promissores no controle de fungos e bactérias. Na cultura do tomate, na qual se concentra grande parte dos estudos, o ASM não teve efeito direto *in vitro* sobre seus principais patógenos bacterianos, *Xanthomonas vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv.

tomato, mesmo nas maiores concentrações (Kobayashi *et al.*, 2001). Em experimentos conduzidos em casa-de-vegetação, o ASM foi eficiente no controle de *R. solanacearum* e *X. vesicatoria*. Silva *et al.* (2001d) verificaram redução na incidência de *R. solanacearum* após 2 pulverizações foliares (2,5 g i.a./100 L). Para o controle de *X. vesicatoria*, após 3 pulverizações do produto, foi observada redução na severidade da doença em torno de 50 a 60% em relação à testemunha (Silva *et al.*, 2001e; 2003a; 2003b). Em experimentos conduzidos em campo, Castro *et al.* (2000; 2001) verificaram que a adição do ASM ao programa do agricultor proporcionou significativa redução nos sintomas de requeima, pinta preta, septoriose e murcha bacteriana e aumentos na produção e qualidade dos frutos, quando comparados ao programa padrão do agricultor.

Em feijão, o uso do ASM tem sido eficiente no controle de *Phaeoisariopsis griseola* e *X. campestris* pv. *phaseoli* (Romeiro *et al.*, 1999; Jesus Júnior *et al.*, 1999). No entanto, não teve eficiência para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Soares e Maringoni, 2002).

Enquanto nenhum dos derivados de INA foi comercializado (principalmente devido à tolerância insuficiente da cultura), eles serviram como importante ferramenta na pesquisa para investigar a biologia e o modo de ação de SAR induzida por químicos (Oostendorp *et al.*, 2001). Isto levou à primeira demonstração de que compostos xenobióticos podem induzir o mesmo espectro de resistência e as mesmas mudanças bioquímicas, como previamente descrito para a indução biológica de SAR em pepino e fumo (Kessmann *et al.*, 1994). INA é completamente sistêmico e não requer a produção de AS para a ativação da resposta de SAR. Como o INA, o espectro da ativação de resistência e mudanças bioquímicas induzidas por ASM se igualam àquelas da indução biológica nas culturas em que tais informações são disponíveis (Friedrich *et al.*, 1996). Em plantas tipo selvagem, esta ativação por ASM ocorre sem o acúmulo

de AS. Em plantas transgênicas de fumo e *Arabidopsis NahG*, o ASM é completamente ativo. Em adição, mutantes *nim1* de *Arabidopsis* selecionados para a insensibilidade a ASM perderam ao mesmo tempo sua resposta a AS e INA, bem como aos indutores biológicos de SAR (Ryals *et al.*, 1996). Isto é uma forte evidência de que ASM e INA são ativos na via de sinalização da indução biológica de SAR no local de ação de AS ou posteriormente ("downstream") (Ryals *et al.* 1996). Estes compostos são sistêmicos por si só e não podem induzir o sinal sistêmico ainda indefinido no processo biológico de SAR, nem induzem a produção de AS em plantas tratadas.

Probenazole (ORYZEMATE) é usado principalmente em arroz contra brusone (*Pyricularia oryzae*) e requeima bacteriana foliar (*Xanthomonas oryzae*) (Oostendorp *et al.*, 2001). Seu modo de ação não é bem entendido em parte porque sistemas biológicos da resistência induzida sistemicamente não são bem definidos em arroz (Oostendorp *et al.*, 2001). Plantas tratadas respondem claramente de forma mais rápida e resistente a infecções por estes dois patógenos. Outros compostos como ácido beta-aminobutírico, bem como extratos de plantas e microrganismos, também têm sido descritos como indutores de resistência. Para a maioria destes, nem o modo de ação nem marcadores confiáveis são conhecidos e, ainda, outras vias para ativação da resistência são suspeitas (Oostendorp *et al.*, 2001).

Químicos indutores de resistência, capazes de induzir ampla resistência à doença, oferecem uma opção adicional para o agricultor complementar a resistência genética à doença e ao uso de fungicidas. Se integrados, apropriadamente, em programas de manejo de plantas saudáveis, eles podem prolongar a vida útil de genes de resistência e de fungicidas usados atualmente.

2.2.2 Resistência sistêmica induzida (ISR) por rizobactérias

A rizosfera de plantas é uma zona de intensa atividade microbiana e algumas bactérias desta zona, chamadas de rizobactérias, exibem ativa colonização da raiz na presença da microflora nativa existente (Zehnder *et al.*, 2001). Certos isolados de bactérias da rizosfera são referidos como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, pois sua aplicação frequentemente é associada a crescentes taxas de crescimento de plantas (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Pieterse *et al.*, 2000; Zehnder *et al.*, 2001). Esses microrganismos são internacionalmente designados de PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), no ocidente, e pelo seu homônimo YIB (Yield Increasing Bacteria) na China e em outros países (Romeiro, 2000).

O aumento da produtividade da planta resulta, em grande parte, da supressão de microrganismos deletérios e patógenos pelas PGPR. Rizobactérias do grupo *Pseudomonas* spp. fluorescentes estão entre as mais efetivas em reduzir doenças em solos supressivos, onde a incidência é baixa, apesar da presença de patógenos e de condições conducivas à ocorrência da doença. Estas bactérias podem antagonizar patógenos presentes no solo através de vários mecanismos, como, por exemplo, produção de sideróforos atuando na competição por ferro e antibióticos suprimindo microrganismos competidores (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998).

Alguns desses isolados biocontroladores também são capazes de reduzir a doença através de um mecanismo mediado pela planta que é fenotipicamente similar a SAR induzida pelo patógeno, em que a resistência induzida é sistemicamente ativada e se estende às partes aéreas da planta (Pieterse *et al.*, 2001). Este tipo de resistência induzida frequentemente é referida como ISR mediada por rizobactérias (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). ISR mediada por rizobactérias tem sido demonstrada em muitas plantas, como feijão, cravo,

pepino, rabanete, fumo, tomate e a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sendo efetiva contra um amplo espectro de patógenos de planta, incluindo fungos, bactérias e vírus (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998).

Devido ao fato de muitas rizobactérias que ativam ISR poderem também inibir diretamente o crescimento de um patógeno, sua capacidade para suprimir doença pode envolver mais de um mecanismo (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Então, para provar que a resistência é induzida e verdadeiramente sistêmica, as rizobactérias indutoras devem estar ausentes do local do desafio com o patógeno e não entrar em contato direto com o patógeno desafiador durante o experimento (Hoffland, Bakker e van Loon, 1997; van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Entretanto, muitos estudos nos quais a resistência induzida é considerada o mecanismo responsável pela redução da doença não têm atendido especificamente este ponto (Hoffland, Bakker e van Loon, 1997; van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Procedimentos comuns para acompanhar a resistência induzida são: mistura da suspensão bacteriana com solo autoclavado; imersão das raízes de plântulas na suspensão bacteriana durante o transplante; ou cobertura das sementes com alta concentração de rizobactéria antes da semeadura (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Subsequentemente, as plântulas são desafiadas por um patógeno. Devido às rizobactérias estarem presentes nas raízes, a proteção sistêmica contra patógenos presentes no solo deve ser demonstrada pela aplicação da bactéria indutora em uma parte do sistema radicular e o patógeno desafiador em outra parte, pelo uso do sistema de raízes bipartidas (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Testar a proteção contra patógenos foliares é mais fácil porque os patógenos são naturalmente separados das rizobactérias. Entretanto, as rizobactérias aplicadas às sementes, ou ao solo, onde as sementes são semeadas ou as plântulas transplantadas, podem se mover dentro do interior dos tecidos vegetais aéreos e se manter, até certo ponto, na parte externa das superfícies aéreas (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998).

Nos estudos em que a ISR mediada por rizobactérias e SAR induzida por patógeno foram comparadas diretamente, o nível de supressão da doença foi similar (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Em rabanete, Hoffland, Hakulinen e van Pelt (1996) verificaram que além de o nível de proteção ser similar, o espectro de resistência induzido pelo isolado WCS417 de *Pseudomonas fluorescens* foi mais amplo do que o induzido pelo patógeno *P. syringae* pv. *tomato*. Embora a indução de SAR não seja dependente do desenvolvimento da reação de hipersensibilidade, é expressa ao máximo quando o patógeno indutor causa necrose (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Em contraste, a rizobactéria indutora tipicamente não causa qualquer sintoma visível no hospedeiro e, comumente, aumenta o crescimento da planta (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Steiner e Schönbeck (1995) formularam os seguintes critérios para a verificação de SAR e para distinguir resistência induzida de outros mecanismos que podem reduzir a incidência ou severidade da doença:

- 1) Supressão da resistência induzida por uma prévia aplicação de inibidores específicos;
- 2) Ausência de efeitos tóxicos do agente indutor no patógeno desafiador;
- 3) Necessidade de um intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e o início de proteção na planta;
- 4) Ausência de uma típica correlação entre dose e resposta conhecida para componentes tóxicos;
- 5) Não especificidade de proteção;
- 6) Proteção local, bem como sistêmica;
- 7) Dependência do genótipo da planta.

Estes critérios são úteis para comparar as características da ISR mediada por rizobactérias e SAR (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). Enquanto SAR tem sido documentada em múltiplas espécies de plantas (item 2.2.1), os estudos sobre ISR mediada por rizobactérias, têm-se concentrado apenas em poucas

espécies. Notavelmente, não tem sido relatado ISR em monocotiledôneas (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998).

A ISR mediada por rizobactéria é um processo complexo que pode envolver vários componentes bacterianos, tais como, o LPS, sideróforos, flagelos e ácido salicílico (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2001), e varia com as condições limitantes de ferro, isolados bacterianos, plantas hospedeiras e seus cultivares (Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Um sistema modelo baseado em *Arabidopsis* tem sido desenvolvido para estudar a base molecular da ISR mediada por rizobactérias (Pieterse *et al.*, 1996). Uma ferramenta essencial para tal estudo é o uso de plantas transgênicas NahG, que não acumulam ácido salicílico, e de mutantes como *jar1-1* (resposta a AJ), *etr1-1* (resposta a etileno) e *npr1-1* (regulador de SAR). O agente indutor utilizado é o isolado WCS417r da rizobactéria não patogênica *Pseudomonas fluorescens*, responsável em disparar ISR por várias espécies de plantas (Pieterse *et al.*, 2001).

Os estudos realizados têm demonstrado que ao contrário de SAR induzida pelo patógeno, a ISR mediada pelo isolado WCS417r de *P. fluorescens* em *Arabidopsis* é independente do acúmulo de AS e da ativação dos genes PR (Pieterse *et al.*, 1996) e que a transdução de sinal que leva a ISR requer a resposta ao ácido jasmônico e ao etileno e, similar a SAR, é dependente da proteína NPR1 (Pieterse *et al.*, 1998). Este requerimento para a proteína NPR1 indica que SAR induzida por patógenos e ISR induzida por rizobactérias convergem próximo ao final ("downstream") da rota de sinalização (Pieterse *et al.*, 1998). Evidentemente, NPR1 regula diferentemente a expressão do gene relacionado com ISR e SAR, dependendo da rota que é ativada no início ("upstream") dela. Mas nem todas as rizobactérias indutoras de ISR disparam uma rota independente de ácido salicílico. Por exemplo, *P. aeruginosa* TNSK2 e o isolado de *P. fluorescens* P3, geneticamente modificados e superprodutores de

ácido salicílico, têm disparado uma rota SAR dependente de ácido salicílico, por sua produção na superfície da raiz (De Meyer e Höfte, 1997; De Meyer *et al.*, 1999).

Também tem sido demonstrado, neste sistema, que a sinalização do etileno é requerida no local de aplicação do indutor, sugerindo o envolvimento do etileno na geração ou translocação do sinal de ISR transportado sistemicamente (Knoester *et al.*, 1999) e que o isolado WCS417r dispara a mesma rota de sinalização sistêmica quando aplicado às raízes ou às folhas de *Arabidopsis* (Pieterse *et al.*, 2000).

As moléculas de sinalização de plantas, ácido salicílico e ácido jasmônico, têm um importante papel nas rotas de resistência induzida a doenças. A interação entre as vias de sinalização de defesa tem sido demonstrada: o ácido jasmônico e o etileno podem atuar em conjunto na ativação de respostas de defesa, enquanto o AS pode suprimir as respostas dependentes de ácido jasmônico (Pieterse e van Loon, 1999). Junto com o fato de que ISR e SAR compartilham o fator regulador NPR1, a questão que foi levantada é em que extensão a via ISR dependente de ácido jasmônico e a via SAR dependente de AS interagem. Recentemente, van Wees *et al.* (2000) investigaram possíveis interações entre as duas vias. De forma interessante, a ativação simultânea destas vias resultou em um efeito aditivo no nível de proteção induzida contra o isolado DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* (Pst DC3000). Em genótipos de *Arabidopsis* bloqueados em SAR ou ISR, esse efeito aditivo não foi evidente. Além disso, a expressão do gene marcador de SAR, PR-1, não foi alterada em plantas que expressam ISR e SAR comparada com aquela em plantas que expressam apenas SAR, indicando que as rotas de SAR e ISR são compatíveis e que não há interação significativa entre estas rotas de sinalização. Além disso, plantas que expressam ambos os tipos de resistência induzida não mostraram níveis elevados de transcritos *Npr1*. Aparentemente, o nível constitutivo de NPR1 é suficiente

para facilitar a expressão simultânea de SAR e ISR. Isto sugere que o aumento do nível de proteção foi estabelecido através da ativação paralela de respostas de defesa complementárias, dependentes de NPR1.

Apesar dos avanços sobre os mecanismos que estão por trás da ISR mediada por rizobactérias, a via pela qual ela é induzida não está completamente decifrada e os seus marcadores ainda não foram identificados. No patossistema pepino - *Erwinia tracheiphila*, em que a bactéria é transmitida por inseto vetor, foi demonstrado que a ISR mediada por rizobactérias contra a murcha bacteriana e a alimentação pelos vetores foram associadas a concentrações reduzidas de cucurbitacina, um metabólito secundário da planta e potente estimulante de alimentação para o inseto. O tratamento com rizobactérias levou a ISR contra a murcha bacteriana na ausência de insetos vetores, sugerindo que ISR mediada por PGPR protege o pepino contra a murcha bacteriana não apenas por reduzir a alimentação do vetor e a transmissão do patógeno, mas também pela indução de outros mecanismos de defesa da planta após o patógeno ser introduzido dentro dela (Zehnder *et al.*, 2001).

O uso de rizobactérias na indução de resistência para o controle de doenças de plantas pode vir a ser uma alternativa ao brometo de metila. Devido aos seus efeitos deletérios na depleção do ozônio, o brometo de metila deverá ter redução de 100% em sua produção e uso até 2005 nos países desenvolvidos. Estudos têm avaliado a promoção de crescimento e a ISR mediada por PGPR em parcelas de pepino com e sem a fumigação do solo com brometo de metila (Zehnder *et al.*, 2000). Nas parcelas fumigada e não fumigada, o número de insetos vetores e a incidência da murcha bacteriana foram significativamente menores com o tratamento com PGPR do que a testemunha não bacterizada. Entretanto, nas parcelas tratadas com PGPR, a incidência da murcha bacteriana foi significativamente menor em tratamentos não fumigados, comparado com tratamentos fumigados, indicando que o nível de ISR mediada por PGPR foi

maior sem a fumigação com brometo de metila. Isto sugere que a fumigação do solo teve um efeito negativo na ISR mediada por PGPR, possivelmente pela eliminação da microbiota do solo. No entanto, medidas da altura de plantas demonstraram que a taxa de crescimento em pepino nos tratamentos com PGPR não fumigados foram equivalentes às taxas de crescimento em tratamentos fumigados sem PGPR, indicando que em sistemas de produção de pepino, PGPR podem ter potencial como alternativa biológica à fumigação com brometo de metila.

No Brasil, vários laboratórios vêm selecionando rizobactérias com potencial de indução de resistência em várias culturas, dentre elas tomate, contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Corynespora cassiicola*, *Xanthomonas vesicatoria* (Silva *et al.*, 2001a; 2001b; 2001c; Leite *et al.*, 1998); soja, contra *P. syringae* pv. *glycinea* (Coelho, Pereira e Romeiro, 1998); e algodão, contra *X. campestris* pv. *malvacearum* (Nascimento *et al.*, 1999). Nestes trabalhos, as sementes foram microbializadas com suspensão de rizobactérias e então desafiadas com o patógeno. Embora estes trabalhos ainda em fase de seleção sejam de suma importância, há necessidade de se aprofundarem os estudos em ISR mediada por rizobactérias em outras espécies de plantas além de *Arabidopsis*. Em trabalhos como o de Silva *et al.* (2004), nos quais foram testados 3 isolados de rizobactérias (B101R, B212R e A068R), previamente selecionados como indutores de resistência sistêmica em tomateiro a *P. syringae* pv. *tomato*, contra vários patógenos de doenças foliares em tomate, verificou-se que o isolado B101R reduziu a intensidade das doenças causadas por *Alternaria solani*, *Stemphiliium solani* e *Oidium lycopersici*. Os autores mediram também a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, lipoxigenase e peroxidase das plantas tratadas com o isolado B101R e inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato* e verificaram o aumento na atividade da lipoxigenase e peroxidase, enquanto nenhum aumento na atividade da fenilalanina amônia liase foi observado.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 2000. Anuário da Agricultura Brasileira. FNP Consultoria & Comércio. São Paulo. 2000. 546p.
- BALMER, E.; CRUZ, B.P.B.; SILVEIRA, A.P. da. Ocorrência de fungos que afetam as maçãs do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de São Paulo. *Arquivos de Instituto Biológico*, São Paulo, v.34, n.3, p.161-167, 1967.
- BAUSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, Oxford, v.52, n.6, p.747-753, Dec., 2003.
- BELTRÃO, N.E.M. Bom negócio para o Nordeste. *Cultivar*, Pelotas, v.8, n.8, p.19-20, ago., 1999.
- CASTRO R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; AZEVEDO, L.A.S. Efeito do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl na proteção contra doenças, incremento de produção e qualidade de frutos em tomate estaqueado. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.492, ago., 2001. (Suplemento).
- CASTRO, R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; GUICHERIT, E. Redução na severidade de doenças e incremento da produção e qualidade dos frutos de tomate estaqueado em áreas comerciais através da aplicação do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, p.324, ago., 2000. (Suplemento).
- CHIAVEGATO, E.J. Produção de bacteriocinas por diferentes isolados e raças fisiológicas de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. Smith, 1901) Dye, 1978. Piracicaba: ESALQ, 1988, 62p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.3, n.3, p.167-177, maio/jul., 1977.
- CIA, E.; FERRAZ, C.A.M.; SOAVE, J.; SUGIMORI, M.H. Quadro sintomatológico causado por *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 2, n.3, p.172-177, set., 1976.
- CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do Algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, K.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (eds.). *Manual de Fitopatologia*. 3.ed São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. Cap.6, v.2, p.33-48.

COELHO, R.A.; PEREIRA, J.L.A.; ROMEIRO, R.S. Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento e como indutoras de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.208, ago., 1998. (Suplemento).

CRUZ, B.P.B.; SILVEIRA, A.P.; ABRAÃO, J.; SILVEIRA, S.G.P. Observações preliminares sobre o controle químico da mancha angular do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.31, n.6, p.117-119, jun., 1965.

DE MEYER, G.; CAPIEAU, K.; AUDENAERT, K.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.P.; HÖFTE, M. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.12, n.5, p.450-458, May, 1999.

DE MEYER, G.; HÖFTE, M. Salicylic acid produced by the rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.6, p.588-593, June, 1997.

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

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

HOFFLAND, E.; BAKKER, P.A.H.M.; VAN LOON, L.C. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.2, p.138, 1997.

HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; VAN PELT, J.A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.7, p.757-762, July, 1996.

JESUS JUNIOR, W.C.; ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; PEREIRA, J.L.A. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.293, ago., 1999. (Suplemento).

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, 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.

- KNOESTER, M.; PIETERSE, C.M.; BOL, J.F.; VAN LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.12, n.8, p.720-727, Aug., 1999.
- KOBAYASTI, L.; SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito *in vitro* do indutor de resistência acibenzolar-s-metil sobre bactérias patogênicas ao tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.293, ago., 2001. (Suplemento).
- LEITE, A.S.V.; BRITO, A.P.; ROMEIRO, R.S.; FERNANDES, M.C.A. Rizobactérias selecionadas como indutoras de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e a *Corynespora cassiicola* mas inefetivas para o biocontrole da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.210, ago., 1998. (Suplemento).
- MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, London, v.82, n.5, p.535-540, Nov., 1998.
- MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.1, p.13-18, Jan., 2001.
- MOHAN, S.K. Seed transmission and epidemiology of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, n.3, p.859-865, 1983.
- NASCIMENTO, J.F.; ROMEIRO, R.S.; RUANO, C.S.O.; PIZZINATO, M.A. Microbiolização de sementes de algodoeiro com rizobactérias, promoção de crescimento e indução de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.252, ago., 1999. (Suplemento).
- OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.1, p.19-28, Jan., 2001.
- PENNA, J.C.V. Cultivares diferentes, lucro maior. **Cultivar**, Pelotas, v.2, n.17, p.32-36, jun., 2000.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defence pathways. **Trends in plant science**, London, v.4, n.2, p.52-58, Feb., 1999.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; TON, J.; PARCHMANN, S.; MUELLER, M.J.; BUCHALA, A.J.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis*

requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.57, n.3, p.123-134, Sept., 2000.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; LÉO-KLOOSTERZIEL, K.M.; KEURENTJES, J.J.B.; VERHAGEN, B.W.M.; KNOSTER, M.; VAN DER SLUIS, I.; BAKKER, P.A.H.M.; VAN LOON, L.C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.1, p.51-61, Jan., 2001.

PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, n.8, p.1225-1237, Aug., 1996.

PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOSTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v.10, n.9, p.1571-1580, Sept., 1998.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. **Crop Protection**, Oxford, v.20, n.1, p.1-11, Feb., 2001.

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.

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

ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; JESUS JÚNIOR, W.C.; PEREIRA, J.L.A. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. campestris* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.255, ago., 1999. (Suplemento).

ROMERO, A.M.; KOUSIK, C.S.; RITCHIE, D.F. Resistance to bacterial spot Bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, n.2, p.189-194, Feb., 2001.

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

- SILVA, H.S.A.; DEUNER, C.C.; ROMEIRO, R.S.; CARRER FILHO, R.; BATISTA, U.G. Em suporte à estratégia de seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e para indução de resistência sistêmica e plantas com direcionamentos distintos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.304, ago., 2001a. (Suplemento).
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U.G.; CARRER FILHO, R. Biocontrole experimental da mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) - antagonismo microbiano ou indução de resistência sistêmica? *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.27, n.1, p.106, jan./mar., 2001b.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; DEUNER, C.C.; CARRER FILHO, R.; GARCIA, F.A.O. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p. 281, ago., 2001c. (Suplemento).
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, San Diego, v.29, n.2, p.288-295, Feb., 2004.
- SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.294, ago., 2001d. (Suplemento).
- SILVA, L.H.C.P.; MARTINS Jr., H.; MORAES, S.R.; RESENDE, M.L.V.; SOUZA, R.M.; CASTRO, R.M. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-s-metil (BTH) contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em cinco genótipos de tomateiro industrial. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.27, n.1, p.119, jan./mar., 2001e.
- SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R.; CASTRO, A.M.S. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.29, n.2, p.177-181, abr./jun., 2003a.
- SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R. Avaliação comparativa do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* no tomateiro. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.29, n.3, p.244-248, jul./set., 2003b.
- SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C. Efeito de acibenzolar-s-methyl sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à

murcha-de-Curtobacterium. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.28, n.1, p.41-45, jan./mar., 2002.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocts. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Eds.). *Induced resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology)*. Dordrech: Kluwer Academic Pub., 1995. p.86-110.

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

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mehanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.18, p.259-288, 1980.

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

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.

VAN WEES, A.C.M.; SWART, E.A.M.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Enhanced of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v.97, n.15, p.8711-8716, 2000.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal Systematic Bacteriology*, Washington, v.45, n.3, p.472-489, July, 1995.

VENÂNCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L.; PERES, N.A.R.P. Novos fungicidas. II - famoxadone e indutores de resistência. *Revisão Annual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.8, p.59-92, 2000.

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.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L. Coordinate gene activity in response to agents that

induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v.3, n.10, p.1085-1094, Oct., 1991.

WATKINS, G.M. **Compendium of cotton diseases**. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1981. 87p.

ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.J.; KLOEPPER, J.W.
Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.1, p.39-50, Jan., 2001.

ZEHNDER, G.W.; YAO, C.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Influence of methyl bromide fumigation on microbe-induced resistance in cucumber. **Biocontrol Science and Technology**, Hants, v.10, n.5, p.687-693, Oct., 2000.

CAPÍTULO 2

**Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias em algodão
contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum***

1 RESUMO

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias em algodoeiro contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro. Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Tese – Doutorado em Fitopatologia).*

Avaliou-se o potencial de rizobactérias na indução de resistência do algodoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. Após o isolamento das rizobactérias, foram selecionados os isolados capazes de reduzir os sintomas da mancha angular bacteriana em casa-de-vegetação, os quais foram aplicados espacialmente separados do patógeno desafiador. Em seguida, os melhores isolados foram testados quanto à capacidade de inibir diretamente o patógeno *in vitro*. Para os isolados que não tiveram efeito inibitório *in vitro* foi avaliada a melhor época de aplicação e também o efeito de concentrações crescentes sobre o nível de resistência induzida. Foi realizada a caracterização parcial dos isolados selecionados. Do total de 123 isolados de rizobactérias foram selecionados quatro, L2-1, MT1-12, MT4-8 e MT7-10, os quais apresentaram 48,91%, 38,49%, 37,92% e 21,75% de controle em relação à testemunha, respectivamente. Nenhum destes isolados apresentou efeito inibitório direto *in vitro* a *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. Quando se avaliou o efeito de diferentes épocas de aplicação e diferentes concentrações, verificou-se que para os quatros isolados, não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas. Quanto à época de aplicação, apenas para o isolado MT1-12 houve diferença significativa, sendo aos 14 dias antes da inoculação do patógeno a melhor época utilizada.

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

2 ABSTRACT

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Induction of cotton systemic resistance by rhizobacteria against *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: Induction of systemic resistance by rhizobacteria and acibenzolar-S-methyl (ASM) to control of cotton bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*). Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Thesis - Doctorate in Phytopathology).

The potential of rhizobacteria in induction of resistance in cotton against *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* was evaluated. After rhizobacteria isolation, strains capable to reduce symptoms of cotton bacterial blight in greenhouse were selected. The best strains were evaluated according to the capacity to inhibit the pathogen directly *in vitro*. The strains without antimicrobial activity *in vitro* were used to test the best application time and the dosage levels to induce resistance. The strains selected were characterized partially. From 123 rhizobacterium strains, four strains were selected, MT1-12, MT4-8, MT7-10 and L2-1, that they showed potential in reducing severity of cotton bacterial blight with a protection of 48.91%, 38.49%, 37.92% and 21.75% in relation to the untreated plants, respectively. None of those presented antimicrobial activity to *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. When it was evaluated the effect of different application times and different concentrations, it was verified that to the four strains selected, there was no significant difference among concentrations used. Only MT1-12 isolate showed significant difference among period of time of inoculation and the best period was 14 days before the inoculation.

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

3 INTRODUÇÃO

A cultura do algodão vem aumentando significativamente em área e produção no Brasil especialmente na região Centro-oeste, principal produtora do país, responsável por 63,8% da produção nacional (Cassetari Neto e Machado, 2000). O alto investimento em tecnologia, e principalmente o plantio em extensas áreas, requerem medidas eficientes no que diz respeito a fatores limitantes, como as doenças, para obtenção de índices satisfatórios de produtividade. Dentre as principais doenças que ocorrem no algodão, a mancha angular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) (Vauterin, Hoste, Kersters e Swings, 1995) (Xam), tem se destacado nas principais regiões produtoras, particularmente em áreas irrigadas e em regiões com alta precipitação na época de desenvolvimento da cultura, causando enorme preocupação aos cotonicultores, por ser uma doença de difícil controle e também pelo alto consumo de agroquímicos já empregados no cultivo do algodão. Na Índia esta doença sozinha é responsável por aproximadamente 27% das perdas da cultura (Mishra, Krishna e Krishna, 2001).

Durante seu desenvolvimento em condições naturais, as plantas interagem continuamente com microrganismos do solo. A colonização da rizosfera das plantas por estes microrganismos resulta em modificações em seu crescimento e desenvolvimento. Certos isolados de bactérias da rizosfera elevam a produtividade das culturas e exercem o controle de doenças. Dentre os mecanismos de ação das rizobactérias, a resistência sistêmica induzida ou ISR mediada por rizobactérias (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998) pode ser fundamental na utilização prática dessas bactérias, uma vez que possui múltipla ação contra patógenos, apesar de agir distante do local de atuação dos mesmos no hospedeiro (Mariano e Kloepper, 2000).

O estudo da resistência de plantas induzida por rizobactérias no controle de doenças bacterianas tem mostrado resultados promissores em várias culturas, dentre elas tomate, contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* (Leite et al., 1998; Silva et al. 2001a; 2001b; 2004; Jetiyanon e Kloepper, 2002); soja, contra *P. syringae* pv. *glycinea* (Coelho, Pereira e Romeiro, 1998); fumo, contra *P. syringae* pv. *tabaci* (Park e Kloepper, 2000); pepino, contra *Erwinia tracheiphila* (Zehnder et al., 2000; 2001); e algodão, contra *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Nascimento et al., 1999). No entanto, a maioria destes trabalhos ainda se encontra em fase de seleção. Além da seleção de isolados eficientes em reduzir os sintomas das doenças, há necessidade de se determinarem parâmetros como concentração, época e forma de aplicação para a sua utilização em sistemas de manejo da cultura.

Assim, objetivou-se neste trabalho selecionar isolados de rizobactérias capazes de induzir resistência sistêmica a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em plântulas de algodão; avaliar o efeito *in vitro* destes isolados sobre *X. axonopodis* pv. *malvacearum*; caracterizar parcialmente os isolados; e determinar a concentração e época de aplicação dos isolados de rizobactérias na indução de resistência do algodoeiro a *X. axonopodis* pv. *malvacearum*.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem, isolamento e preservação do patógeno

O isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) foi obtido de folhas de algodoeiro apresentando lesões típicas da mancha angular, coletadas e herborizadas na região produtora do Estado de Mato Grosso. Posteriormente, procedeu-se ao isolamento no Laboratório de Bacteriologia do DFP/UFLA, utilizando-se o meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e o método de estrias paralelas e posterior incubação por 48 h a 28 °C. Em seguida, colônias isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio 523 inclinado. A patogenicidade do isolado foi constatada pela inoculação através de pulverização da face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC) /mL. As plântulas foram mantidas por 24 h antes e depois da inoculação em câmara úmida, sendo em seguida levadas para casa-de-vegetação. Após o aparecimento dos sintomas, o patógeno foi reisolado das lesões. A preservação do isolado durante o decorrer do experimento foi em peptona glicerol a -80 °C (Lazo e Gabriel, 1987) e em folhas herborizadas.

4.2 Isolamento e preservação de rizobactérias

Amostras de raízes de plantas de algodão sadias foram coletadas nos municípios de Rondonópolis, Primavera do Leste e Campo Verde, no Mato Grosso, e de Lavras, em Minas Gerais. As amostras coletadas no campo foram umedecidas, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia da UFLA. As raízes foram lavadas sob água corrente para remoção do solo aderido.

Amostras de raízes (1 g) foram colocadas em tubos contendo 9 mL de solução salina (0,85%) autoclavada e colocadas por 5 minutos em banho de ultrassom. Alíquotas de 0,1 mL de uma série de diluições foram semeadas, em duplicata, na superfície do meio Ágar Nutriente (NA) e incubadas por 48 horas a 25 °C em câmara de crescimento (BOD). As colônias bacterianas, com diferentes características morfológicas, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio NA inclinado e armazenadas a -4 °C (Lucon e Melo, 1999; Mariano *et al.*, 2000). A preservação dos isolados durante o decorrer do experimento foi em peptona glicerol a -80 °C (Lazo e Gabriel, 1987).

4.3 Seleção de rizobactérias com potencial para controlar a mancha angular do algodoeiro em condições de casa-de-vegetação

Sementes de algodão da cultivar CNPA Ita 90, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, foram semeadas na mistura de solo:areia:esterco (2:1:1) previamente esterilizada com brometo de metila, e acondicionada em vasos com capacidade de 1,5 kg. Os tratamentos com as rizobactérias foram realizados aos 15 dias após o plantio, pela irrigação do solo com 100 mL de suspensão bacteriana dos isolados obtidos, na concentração $A_{600} = 0,25$. A inoculação de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* foi realizada 3 semanas após o tratamento com as rizobactérias (van Wees *et al.*, 2000), ou seja, 36 dias após o plantio, pulverizando-se a face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL. As plântulas foram mantidas por 24 h antes e depois da inoculação em câmara úmida, sendo em seguida levadas para casa-de-vegetação.

A altura das plantas foi medida antes do tratamento com as rizobactérias e na avaliação da severidade da mancha angular, realizada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno. Para todos os ensaios foi utilizada uma

adaptação da escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977), a qual é baseada em um critério de notas variando de 0 a 4, conforme a severidade da doença (Tabela 1).

TABELA 1 – Escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977) adaptada para severidade da mancha angular do algodoeiro.

Nota	Severidade
0	0% de folha lesionada
1	de 1 a 25% de folha lesionada
2	de 26 a 50% de folha lesionada
3	de 51 a 75% de folha lesionada
4	acima de 76% de folha lesionada

O experimento foi dividido em vários ensaios, nos quais se avaliaram 20 isolados de rizobactérias de cada vez. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 21 tratamentos (1 testemunha e 20 isolados de rizobactérias) e 4 repetições (2 plantas por repetição).

Os isolados que proporcionaram redução significativa da severidade em relação à testemunha, foram submetidos a uma nova seleção, em que foram avaliados 10 isolados de rizobactérias de cada vez. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 11 tratamentos (1 testemunha e 10 isolados de rizobactérias) e 4 repetições (4 plantas por repetição). A severidade da mancha angular foi avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno, segundo a escala de Sidhu e Webster (1977) (Tabela 1).

4.4 Efeito *in vitro* de rizobactérias sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (detecção de antibiose)

Um dos critérios para distinguir a resistência induzida de outros mecanismos que podem reduzir a incidência ou severidade da doença é a ausência de efeitos tóxicos do agente indutor no patógeno desafiador (Steiner e Schönbeck, 1995). Para verificar tal critério, avaliou-se o efeito *in vitro* dos isolados MT1-12, MT4-8, MT7-10 e L2-1 sobre Xam. Para isto, placas de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970) foram semeadas com 1 µL da suspensão de rizobactérias, em 4 pontos eqüidistantes, e incubadas por 48 horas a 28 °C. Em seguida, as placas foram invertidas e em cada tampa adicionou-se 1 mL de clorofórmio. Após 30 minutos, as placas foram abertas para a completa evaporação do clorofórmio. As colônias de rizobactérias foram, então, recobertas com uma sobrecamada de 5 mL de meio 523 semi-sólido fundente, contendo 100 µL da suspensão de Xam. Após a incubação a 28 °C por 48 horas, as placas de Petri foram examinadas a procura de zonas de inibição, que são indicativas de antibiose (Moura, 1996). Os isolados com efeito inibitório sobre Xam foram descartados.

4.5 Caracterização parcial dos isolados de rizobactérias

Quatro isolados mais promissores na indução de resistência do algodoeiro a Xam foram submetidos à caracterização, através dos seguintes testes: reação de Gram, relação com o oxigênio, presença de catalase e teste para a produção de pigmento fluorescente.

TABELA 2 - Isolados de rizobactérias obtidos de plantas de algodão provenientes dos municípios de Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Primavera do Leste-MT e Campo Verde-MT.

Isolado	Procedência
L1-1; L1-2; L1-3; L1-4; L1-5; L1-6; L1-7	Lavras - MG
L2-1; L2-2; L2-3; L2-4; L2-5; L2-6; L2-7	Lavras - MG
L3-1; L3-2; L3-3; L3-5; L3-6; L3-7; L3-8	Lavras - MG
L4-1; L4-2; L4-3; L4-4; L4-5; L4-6; L4-10; L4-11	Lavras - MG
MT1-1; MT1-2; MT1-3; MT1-4; MT1-5; MT1-6; MT1-7; MT1-8; MT1-9; MT1-10; MT1-11; MT1-12; MT1-13; MT1-14	Rondonópolis - MT
MT2-1; MT2-2; MT2-3; MT2-4; MT2-5; MT2-6; MT2-7; MT2-8; MT2-11	Rondonópolis - MT
MT3-1; MT3-2; MT3-3; MT3-4; MT3-5; MT3-6; MT3-7; MT3-8; MT3-9; MT3-10; MT3-11	Primavera do Leste - MT
MT4-1; MT4-2; MT4-3; MT4-4; MT4-5; MT4-6; MT4-7; MT4-8; MT4-9; MT4-10; MT4-11; MT4-12; MT4-13; MT4-14; MT4-15; MT4-16; MT4-17; MT4-18; MT4-19; MT4-20; MT4-21	Primavera do Leste - MT
MT5-1; MT5-2; MT5-3; MT5-4; MT5-5; MT5-6; MT5-7; MT5-8; MT5-9; MT5-10; MT5-11; MT5-12; MT5-13; MT5-14; MT5-15; MT5-16; MT5-17; MT5-18	Campo Verde - MT
MT6-1; MT6-2; MT6-3; MT6-4; MT6-5; MT6-6; MT6-7	Campo Verde - MT
MT7-1; MT7-2; MT7-3; MT7-4; MT7-5; MT7-6; MT7-7; MT7-8; MT7-9; MT7-10; MT7-11; MT7-12; MT7-13; MT7-14	Campo Verde - MT

No primeiro ensaio, verificou-se que os isolados MT7-10, MT5-6, MT5-8, MT5-5, MT5-17 e MT4-19 (Tabela 3) proporcionaram redução significativa da severidade da mancha angular do algodoeiro em relação à testemunha, sendo que os isolados MT7-10, MT5-6 e MT5-8 apresentaram

21,75, 21,24 e 18,34 % de controle em relação à testemunha, respectivamente, enquanto as plantas tratadas com os isolados MT5-13, MT3-11, MT7-13 e MT6-1 apresentaram maior severidade do que as plantas da testemunha (Tabela 3).

TABELA 3 – Efeito de dez isolados de rizobactérias, previamente selecionados, sobre a severidade (AACPD) da mancha angular do algodoeiro.

Tratamentos	AACP D	Porcentagem de controle em relação à testemunha
MT7-10	72,44 b ¹	21,75
MT5-6	72,91 b	21,24
MT5-8	75,59 b	18,34
MT5-5	83,68 b	9,60
MT5-17	85,89 b	7,22
MT4-19	86,71 b	6,33
Testemunha	92,57 a	-
MT5-13	94,59 a	-
MT3-11	95,23 a	-
MT7-13	102,46 a	-
MT6-1	110,82 a	-
CV (%)	11,77	

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ensaio, todos os isolados proporcionaram redução da severidade da mancha angular do algodoeiro em relação à testemunha (Tabela 4). Eles foram distintos em 3 grupos, em que os isolados L2-1, MT1-12, MT4-8 e MT6-4 formaram o grupo mais eficiente no controle da doença, com a

porcentagem de controle variando entre 35,15 e 48,91% em relação à testemunha, os isolados L2-2, MT6-5, MT5-11 e MT1-4 formaram o grupo intermediário, variando entre 22,81 e 31,01% em relação à testemunha; e os isolados MT7-11 e MT1-5, o grupo da testemunha com 12,16 e 15,31%, respectivamente.

O controle da mancha angular do algodoeiro é relatado pela seleção de bactérias antagonistas, tanto do filoplano (Arya e Parashar, 2002) como da rizosfera (Safiyazov, Mannanov e Sattarova, 1995; Nascimento *et al.*, 1999),

TABELA 4 – Efeito de dez isolados de rizobactérias, previamente selecionados, sobre a severidade (AACPD) da mancha angular do algodoeiro.

Tratamentos	AACPD	Porcentagem de controle em relação à testemunha
L2-1	69,35 c ¹	48,91
MT1-12	83,50 c	38,49
MT4-8	84,28 c	37,92
MT6-4	85,32 c	37,15
L2-2	93,66 b	31,01
MT6-5	96,73 b	28,74
MT5-11	101,37 b	25,33
MT1-4	104,79 b	22,81
MT7-11	114,96 a	15,31
MT1-5	119,24 a	12,16
Testemunha	135,75 a	-
CV (%)	14,48	

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

pelo tratamento de sementes. No entanto, estes trabalhos visaram a capacidade destes antagonistas em inibir diretamente Xam ou ainda estão em fase de seleção.

Desta seleção (Tabelas 3 e 4), os isolados MT7-10 (Tabela 2), L2-1, MT1-12 e MT4-8 (Tabela 4) foram submetidos aos testes *in vitro* (detecção de antibiose), à caracterização parcial e à determinação da melhor época de aplicação e melhor concentração da suspensão bacteriana utilizada.

Do total de 123 isolados de rizobactérias, foram selecionados 4 isolados mais promissores na indução de resistência do algodoeiro a Xam. Estes resultados vislumbram o uso da resistência sistêmica induzida por rizobactérias como uma ferramenta adicional no manejo integrado de doenças de plantas. Além disso, resultados promissores têm sido obtidos com a utilização de misturas compatíveis de isolados de rizobactérias na indução de resistência de plantas. Jetiyanon e Kloepper (2002) verificaram que um isolado (IN937a) e quatro misturas compatíveis de rizobactérias promoveram supressão significativa dos patógenos testados (*Ralstonia solanacearum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e CMV – cucumber mosaic virus). A utilização do solo fumigado com brometo de metila foi primordial para obtenção de grande quantidade de substrato esterilizado para a realização dos experimentos. No entanto, Zehnder *et al.* (2000) demonstraram que as rizobactérias induzem resistência contra a murcha bacteriana do pepino em solos fumigados com brometo de metila e não fumigados e que o nível de proteção da doença foi maior sem a fumigação, sugerindo, assim, que a fumigação do solo tem efeito negativo na resistência induzida por PGPR, possivelmente pela eliminação da microbiota do solo. Estudos são necessários para a confirmação deste efeito negativo.

5.2 Efeito *in vitro* de rizobactérias sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (detecção de antibiose)

De acordo com os resultados, verificou-se que nenhum dos isolados testados apresentou efeito inibidor sobre o patógeno estudado, indicando que a redução da severidade da mancha angular do algodoeiro proporcionada por estes isolados em casa-de-vegetação não foi obtida por antagonismo direto, podendo estar relacionada à indução de resistência. Tal fato diferencia este trabalho daqueles que visam o controle biológico de doenças em que os isolados de rizobactérias são selecionados de acordo com o tamanho da zona de inibição do crescimento do patógeno (Guo *et al.*, 2004).

5.3 Caracterização parcial dos isolados de rizobactérias

Pelo teste de Gram, os isolados L2-1 e MT7-10 são bactérias Gram negativas, enquanto os isolados MT4-8 e MT1-12 são do tipo Gram positivas (Tabela 5). Dentre as bactérias Gram positivas, as pertencentes ao gênero *Bacillus* têm se destacado como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Guo *et al.*, 2004; Jetiyanon e Kloepper, 2002).

Na relação com o oxigênio livre, os isolados MT4-8 e MT7-10 comportaram-se como bactérias aeróbias estritas e os isolados MT1-12 e L2-1, como anaeróbias facultativas (Tabela 5). Para catalase, todos os isolados tiveram reação positiva evidenciada pela formação de bolhas imediatamente após a adição do peróxido de hidrogênio (Tabela 5).

Quanto à fluorescência, verificou-se resultado positivo apenas para o isolado MT7-10 (Tabela 5). Como se trata de um isolado do tipo Gram negativo, provavelmente ele pertence ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*.

TABELA 5 – Caracterização bioquímica dos isolados de rizobactérias obtidos de plantas de algodão e previamente selecionados para o controle da mancha angular.

Isolados	Gram	Catalase	Relação com oxigênio	Fluorescência
MT1-12	Gram positivo	+	Anaeróbia facultativa	-
MT4-8	Gram positivo	+	Aeróbia estrita	-
MT7-10	Gram negativo	+	Aeróbia estrita	+
L2-1	Gram negativo	+	Anaeróbia facultativa	-

- Resultado negativo; + Resultado positivo

Isolados de rizobactérias deste grupo têm sido relatados como indutores de resistência de plantas contra várias doenças (Alström, 1991; Hoffland, Hakulinen e van Pelt, 1996; Jeun, et al., 2004).

5.4 Efeito da época de aplicação e concentrações dos isolados de rizobactérias sobre a resistência induzida

Comparando-se o efeito dos 4 isolados de rizobactérias previamente selecionados em diferentes épocas de aplicação e diferentes concentrações, verificou-se que não houve interação significativa entre a concentração, os isolados e as épocas de aplicação; assim, foi realizada a análise individual da concentração. Foi verificado que as duas concentrações utilizadas ($A_{600} = 0,25$ e $A_{600} = 0,50$) diferiram significativamente da concentração 0 (testemunha), mas não diferiram entre si (Tabela 6) quanto à redução da severidade da mancha angular do algodoeiro. Isto prova que, a partir da concentração ótima do agente indutor para desencadear o processo de resistência induzida, o aumento desta

TABELA 6 – Efeito da concentração dos isolados MT1-12, MT4-8, MT7-10 e L2-1 de rizobactérias na indução de resistência do algodoeiro à *X. axonopodis* pv. *malvacearum*.

Concentração	AACPD
0	84,56 a ¹
A ₆₀₀ 0,25	70,61 b
A ₆₀₀ 0,50	67,89 b
CV (%)	21,46

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

dose não implica no aumento da resposta da planta. Segundo Alström (1991), o pré-requisito para a máxima imunização do feijoeiro contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* foi a alta concentração de células viáveis do isolado S97 de *P. fluorescens*, à medida que a proteção contra a doença diminuiu com o aumento das diluições, o que permite concluir que a concentração do inóculo utilizado atingiu o ponto ótimo para a indução de resistência apenas na maior concentração utilizada ($4,6 \times 10^8$ UFC/mL).

O isolado MT1-12 diferiu significativamente dos demais, proporcionando a maior área abaixo da curva de progresso da mancha angular do algodoeiro, quando a bacterização do substrato foi realizada aos 21 dias antes da inoculação do patógeno (Tabela 7). Nas bacterizações feitas aos 14 e 7 dias antes da inoculação, todos os isolados se comportaram de forma semelhante. Entretanto, apesar de não haver diferença significativa, a irrigação do substrato com os isolados de rizobactérias aos 14 dias proporcionou maior redução da severidade da doença, comprovando, assim, a necessidade de um intervalo de tempo entre a aplicação do agente indutor e o início da proteção da planta.

TABELA 7 – Efeito dos isolados MT1-12, MT4-8, MT7-10 e L2-1 de rizobactérias aplicados em diferentes épocas na severidade (AACPD) da mancha angular do algodoeiro.

Isolados	Época de Aplicação (dias antes da inoculação)		
	21	14	7
MT1-12	96,24 ¹ a ² A ³	63,04 a B	71,93 a B
MT4-8	78,68 b A	74,88 a A	77,81 a A
MT7-10	73,38 b A	67,00 a A	74,48 a A
L2-1	67,10 b A	73,40 a A	74,31 a A
CV (%)	21,46		

¹Área abaixo da curva de progresso da mancha angular do algodoeiro.

²Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

³Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a resistência induzida é o mecanismo envolvido na redução da severidade da mancha angular do algodoeiro, isto porque alguns critérios formulados por Steiner e Schönbeck (1995) para distinguir a resistência induzida de outros mecanismos que podem reduzir a incidência ou severidade da doença foram atendidos. Os 4 isolados de rizobactérias selecionados não tiveram efeitos tóxicos *in vitro* sobre Xam, além de estarem separados espacialmente do patógeno desafiador durante todos os experimentos; houve a necessidade de um intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e o início de proteção na planta e a ausência de uma típica correlação entre dose e resposta conhecida para componentes tóxicos.

6 CONCLUSÕES

- 1) Quatro isolados, L2-1, MT1-12, MT4-8 e MT7-10, demonstraram ser promissores na indução de resistência do algodoeiro a *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, com 48,91%, 38,49%, 37,92% e 21,75% de controle em relação à testemunha, respectivamente.
- 2) Os isolados MT1-12, MT4-8, MT7-10 e L2-1 não apresentaram efeito inibidor direto sobre *X. axonopodis* pv. *malvacearum*.
- 3) Não houve diferença significativa entre as concentrações dos isolados de rizobactérias utilizados na indução de resistência a Xam em algodão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSTRÖM, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *Journal Gen. Applied Microbiology*, Tokyo, v.37, n.6, p.495-501, Dec., 1991.
- ARYA, S.; PARASHAR, R.D. Biological control of cotton bacterial blight with phylloplane bacterial antagonists. *Tropical Agriculture*, Trinidad, v.79, n.1, p.51-55, Jan., 2002.
- CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. **Doenças do algodoeiro: diagnose e controle**. Cuiabá: Faculdade de agronomia e Medicina Veterinária (UFMT), 2000. 47p.
- COELHO, R.A.; PEREIRA, J.L.A.; ROMEIRO, R.S. Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento e como indutoras de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* em soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.23, p.208, ago., 1998. (Suplemento).
- GUO, J.H.; QI, H.Y.; GE, H.L.; GONG, L.Y.; ZHANG, L.X.; SUN, P.H. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, San Diego, v.29, n.1, p.66-72, Jan., 2004.
- HOFFLAND, E.; BAKKER, P.A.H.M.; VAN LOON, L.C. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. *Phytopathology*, St. Paul, v.87, n.2, p.138, Feb., 1997.
- HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; VAN PELT, J.A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, n.7, p.757-762, July, 1996.
- JETTYANON, K.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, San Diego, v.24, n.3, p.285-291, July, 2002.
- JEUN, Y.C.; PARK, K.S.; KIM, C.H.; FOWLER, W.D.; KLOEPPER, J.W. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, San Diego, v.29, n.1, p.34-42, Jan., 2004.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, n.6, p.969-976, June, 1970.
- LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.3, p. 448-453, Mar., 1987.

LEITE, A.S.V.; BRITO, A.P.; ROMEIRO, R.S.; FERNANDES, M.C.A. Rizobactérias selecionadas como indutoras de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e a *Corynespora cassiicola* mas inefetivas para o biocontrole da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.210, ago., 1998. (Suplemento).

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.8, p.843-847, Aug., 1995.

LUCON, C.M.M.; MELO, I.S. de. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.25, n.2, p.132-136. abr./jun., 1999.

MARIANO, R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.8, p.121-137, 2000.

MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GÔMES, A.M.A. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: O autor 2000. p.115-119.

MISHRA, S.P.; KRISHNA, A.; KRISHNA, A. Assessment of yield losses due to bacterial blight in cotton. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, Udaipur, v.31, n.2, p.232-233, 2001.

MOURA, A.B. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. Viçosa: UFV, 1996. 64p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).

NASCIMENTO, J.F.; ROMEIRO, R.S.; RUANO, C.S.O.; MARIA A. PIZZINATO, M.A. Microbiolização de sementes de algodoeiro com rizobactérias, promoção de crescimento e indução de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.252, ago., 1999. (Suplemento).

PARK, K.S.; KLOEPPER, J.W. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Biological Control**, San Diego, v.18, n.1, p.2-9, May, 2000.

SAFIYAZOV, J.S.; MANNANOV, R.N.; SATTAROVA, R.K. The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.43, n.1, p.51-54, Sept., 1995.

SIDHU, G.S.; WEBSTER, J.M. The use of aminoacid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. *Physiological Plant Pathology*, London, v.11, n.2, p.117-127, 1977.

SILVA, H.S.A.; DEUNER, C.C.; ROMEIRO, R.S.; CARRER FILHO, R.; BATISTA, U.G. Em suporte à estratégia de seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e para indução de resistência sistêmica e plantas com direcionamentos distintos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.304, ago., 2001a. (Suplemento).

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U.G.; CARRER FILHO, R. Biocontrole experimental da mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) - antagonismo microbiano ou indução de resistência sistêmica? *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.27, n.1, p.106, jan./mar., 2001b.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, San Diego, v.29, n.2, p.288-295, Feb., 2004.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monoct. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Eds.). *Induced resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology)*. Dordrech: Kluwer Academic Pub., 1995. p.86-110.

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.

VAN WEES, A.C.M.; SWART, E.A.M.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Enhanced of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v.97, n.15, p.8711-8716, 2000.

VAUTERIN, L.; HÖSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal Systematic Bacteriology*, Washington, v.45, n.3, p.472-489, June, 1995.

ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.J.; KLOEPPER, J.W. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.107, n.1, p.39-50, Jan., 2001.

ZEHNDER, G.W.; YAO, C.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Influence of methyl bromide fumigation on microbe-induced resistance in cucumber. *Biocontrol Science and Technology*, Hants, v.10, n.5, p.687-693, Oct., 2000.

CAPÍTULO 3

Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular do algodoeiro

1 RESUMO

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular do algodoeiro. In: Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro. Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Tese – Doutorado em Fitopatologia).*

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito *in vitro* do ASM sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), determinar a melhor época de aplicação e dosagem do ASM, bem como a melhor dose de manutenção para o controle da mancha angular do algodoeiro. No ensaio *in vitro*, foram utilizadas as concentrações 0, 10, 50, 100 e 1000 ppm do produto. A avaliação foi realizada medindo-se o halo de inibição do crescimento bacteriano. Para determinar a melhor época de aplicação e dosagem, o ASM foi pulverizado via foliar nas doses de 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g do i.a./100L de água, aos 15, 7 e 3 dias antes da inoculação. A severidade da mancha angular foi avaliada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno. Para determinar a melhor dose de manutenção foram realizadas três aplicações do ASM nas concentrações 10,0; 7,5; 5,0 e 2,5 g i.a./100L de água, com intervalo de aplicação de 14 dias. Nos testes *in vitro*, o ASM não promoveu redução no crescimento da bactéria até 1.000 ppm. Entre as épocas de aplicação não houve diferença significativa, exceto para a dose 2,5 g i.a./100L água, em que a melhor época de aplicação foi aos 3 dias antes da inoculação do patógeno. A dose de 20,0 g i.a./100L de água proporcionou o menor índice de doença, no entanto foi fitotóxica ao algodoeiro. As demais dosagens variaram entre as épocas de aplicação, sendo que, aos 15 dias, as melhores doses foram 5,0 e 10,0 g i.a./100L de água; aos 7 dias, 10,0 g i.a./100L; e aos 3 dias, nenhuma delas diferiu significativamente da testemunha. Quanto às doses de manutenção, o ASM foi mais eficiente no controle da mancha angular quando aplicado uma única vez, aos 7 dias antes da inoculação do patógeno. As doses de manutenção do ASM proporcionaram reduções intermediárias da severidade, não diferindo entre si, sendo que as doses 5,0 e 2,5 g i.a./100L de água não diferiram significativamente da testemunha.

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

2 ABSTRACT

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Effect of acibenzolar-S-methyl (ASM) to control of cotton bacterial blight. In: Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria and acibenzolar-S-methyl (ASM) to control of cotton bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*). Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Thesis - Doctorate in Phytopathology).*

The present work has the objectives to evaluate the effect *in vitro* of ASM on *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*; to determine the best application time and dosage of ASM and the best maintenance dose for the control of cotton bacterial blight. In *in vitro* tests, the concentrations of 0, 10, 50, 100 and 1,000 ppm of the product were used. The inhibition halo of bacterial growth was assessed. To determine the best application time and dose, ASM was sprayed on the leaves, using doses of 0; 2.5; 5.0; 10.0 and 20.0 g a.i./100L of water, at 15, 7 and 3 days before pathogen inoculation. The severity of cotton bacterial blight was evaluated at 7, 14 and 21 days after pathogen inoculation. To determine the best maintenance dose, three applications of ASM were accomplished, using doses (10.0; 7.5; 5.0 and 2.5 g a.i./100L water) with interval of application of 14 days. In tests *in vitro*, ASM did not promote reduction in bacteria growth up to 1,000 ppm. Among the application times there was no significant difference, except for the dose of 2.5 g a.i./100L water, in what the best application time was 3 days before pathogen inoculation. The dose of 20.0 g a.i./100L provided the smallest disease index, however it was phytotoxic to the cotton. The others doses varied between application times. At 15 days, the best doses were 5.0 and 10.0 g a.i./100L, at 7 days, 10.0 g a.i./100L and at 3 days, none of them differed significantly from the plants which were not treated with ASM. Regarding to the maintenance doses, ASM was more efficient when applied just one time at 7 days before pathogen inoculation. The maintenance doses of ASM provided intermediate severity reductions, not differing to each other, and, the doses 5.0 and 2.5 g a.i./100L water did not differ significantly from the plants not treated with ASM.

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

3 INTRODUÇÃO

A mancha angular do algodoeiro, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) (Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995) (Xam), constitui uma doença de grande importância, principalmente em condições favoráveis de temperatura e umidade, podendo causar rasgadura e queda das folhas e danificação dos capulhos, influenciando consideravelmente a produtividade.

De maneira geral, as doenças causadas por bactérias são responsáveis por grandes perdas devido à dificuldade de controle. Depois de instaladas, recorrer ao controle químico normalmente leva a frustrações, já que as bactérias apresentam uma alta taxa de multiplicação, podendo dobrar a população várias vezes ao dia, principalmente em culturas irrigadas. Deste modo, seu controle fica quase restrito às medidas preventivas (Lopes, 2001).

A resistência induzida tem demonstrado seu potencial no controle de doenças de plantas, podendo ser ativada por alguns agentes microbianos, produtos naturais e químicos. Esta resistência é expressa localmente no sítio de ataque do patógeno e sistemicamente em partes da planta não infectadas (Mauch-Mani e Métraux, 1998). Os mecanismos de defesa envolvidos incluem uma combinação de mudanças físicas tais como lignificação da parede celular, formação de papilas ou indução de várias PR proteínas (Kessmann *et al.*, 1994; Van Loon, 1997).

Químicos indutores de resistência oferecem uma opção adicional no manejo integrado de doenças. O acibenzolar-S-metil (ASM) é o ativador de resistência melhor estudado e o primeiro representante de uma nova categoria de produtos utilizados na proteção de plantas, também chamados de ativadores de plantas ou indutores de resistência (Venâncio *et al.*, 2000). Vários exemplos na literatura têm demonstrado o controle de bacterioses pela utilização do ASM

(Bausal, Soylu e Soylu, 2003; Silva *et al.*, 2003a; 2003b; Oostendorp *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2000; 2001; Maia *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001a; 2001b; Romeiro *et al.*, 1999; Jesus Júnior *et al.*, 1999).

Assim, o presente trabalho tem como objetivos: avaliar o efeito *in vitro* do ASM no crescimento de Xam e determinar a melhor época de aplicação e dosagem do ASM para o controle da mancha angular do algodoeiro, bem como a melhor dose de manutenção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito *in vitro* de ASM sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Para a avaliação *in vitro* do efeito de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), foram utilizadas as seguintes concentrações do produto: 0, 10, 50, 100 e 1000 ppm. O ASM foi adicionado em discos de papel de filtro esterilizados com 5,5 mm de diâmetro, em cada placa de Petri contendo meio 523, acrescidos de 5 mL de meio 523 semi-sólido fundente, contendo 100 µL da suspensão bacteriana. Foram adicionados, a cada placa, 2 discos equidistantes com o produto a ser testado, na mesma concentração (Mariano *et al.*, 2000). As placas foram incubadas por 48h a 28 °C. Para efeito de comparação, foi utilizado um tratamento com sulfato de estreptomicina, nas mesmas concentrações. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. As avaliações foram realizadas medindo-se o halo de inibição do crescimento bacteriano promovido pelos produtos.

4.2 Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação do ASM sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação

Para avaliar o efeito de diferentes doses e épocas de aplicação do ASM na indução de resistência sistêmica do algodoeiro à mancha angular bacteriana, sementes de algodão da cultivar CNPA Ita 90 foram semeadas em vasos (1,5 kg) contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1) esterilizada com brometo de metila. As doses de ASM utilizadas foram 20,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 0,0 g do ingrediente ativo/100 L de água, sendo pulverizadas aos 3, 7 e 15 dias antes da inoculação de Xam, realizada 36 dias após o plantio, pulverizando-se a face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10⁹ UFC/mL.

As plantas inoculadas foram mantidas, por 24 h antes e depois da inoculação, em câmara úmida, sendo em seguida levadas para casa-de-vegetação. O experimento foi montado em esquema fatorial 3 x 5 (3 épocas e 5 doses). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 15 tratamentos e 4 repetições (10 plantas/repetição). A avaliação foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno, quando foi avaliada a severidade da mancha angular. Para todos os ensaios foi utilizada uma adaptação da escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977), a qual é baseada em um critério de notas que variam de 0 a 4 conforme a severidade da doença (Tabela 1).

TABELA 1 – Escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977) adaptada para severidade da mancha angular do algodoeiro.

Nota	Severidade
0	0% de folha lesionada
1	de 1 a 25% de folha lesionada
2	de 26 a 50% de folha lesionada
3	de 51 a 75% de folha lesionada
4	acima de 76% de folha lesionada

4.3 Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha angular do algodoeiro

Para se avaliar o efeito de diferentes doses de manutenção do ASM na severidade da mancha angular bacteriana, foram utilizadas sementes de algodão da cultivar CNPA Ita 90 semeadas conforme descrito anteriormente. As doses de

ASM utilizadas foram 10,0; 7,5; 5,0; 2,5 e 0 g do ingrediente ativo/100 L de água, sendo a primeira aplicação aos 7 dias antes da inoculação de Xam, realizada 36 dias após o plantio, conforme descrito no item 4.2, na dosagem de 10,0 g i.a./100L de água para todos os tratamentos, exceto para a testemunha. Para as segunda e terceira aplicações, foram utilizadas as dosagens acima citadas aos 7 e 21 dias após a inoculação do patógeno, respectivamente. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 5 tratamentos e 4 repetições (6 plantas/repetição). A avaliação foi realizada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno, avaliando-se a severidade da mancha angular (escala de Sidhu e Webster, 1977).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito *in vitro* de ASM sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

O ASM não inibiu o crescimento de Xam mesmo nas maiores concentrações testadas (Figura 1). O ASM é indutor de resistência a vários patógenos (Bausal, Soylu e Soylu, 2003; Silva *et al.*, 2003a; 2003b; Romero, Kousik e Ritchie, 2001; Oostendorp *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2000; 2001; Maia *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001a; 2001b; Romeiro *et al.*, 1999; Jesus Júnior *et al.*, 1999) e, portanto, não deveria apresentar atividade tóxica direta sobre o microrganismo estudado. Resultados semelhantes foram obtidos por Kobayasti *et al.* (2001), segundo os quais o ASM não apresentou atividade direta sobre as bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* até a concentração de 1000 ppm.

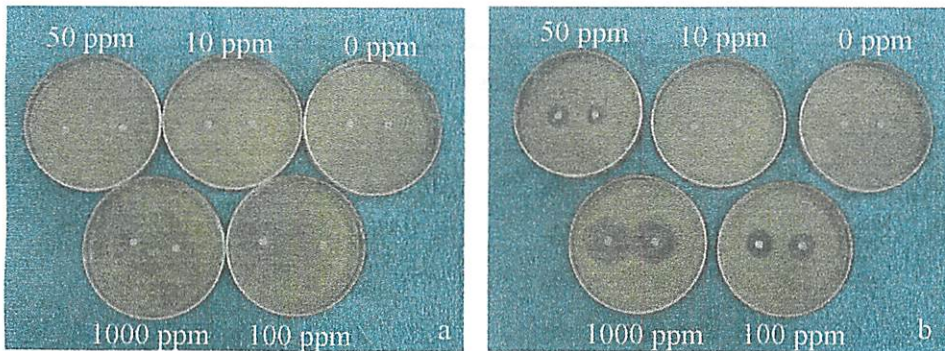


Figura 1 – Efeito do acibenzolar-S-metil (a) e sulfato de estreptomicina (b) sobre o crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* nas concentrações: 0, 10, 50, 100 e 1000 ppm.

5.2 Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação do ASM sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação

Não houve diferença significativa entre as épocas de aplicação do ASM (3, 7 e 14 dias antes da inoculação), exceto para a dose 2,5 g i.a./100 L água, em que a melhor época de aplicação foi aos 3 dias antes da inoculação do patógeno (Tabela 2). Os mecanismos induzidos de resistência requerem um intervalo antes da inoculação do patógeno desafiador. Na maioria dos casos este intervalo tem sido entre 1 e 7 dias. De acordo com Basal, Soyly e Soyly (2003) a melhor proteção contra *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* foi obtida quando o ASM foi aplicado 3 dias antes da inoculação. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et al.* (2003a), segundo os quais a redução da severidade

TABELA 2 - Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação do ASM sobre a severidade (AACPD) da mancha angular do algodoeiro.

Dose (g i.a./100L água)	Dias antes da inoculação		
	15	7	3
0	12,21 ¹ a ² A ³	10,30 a A	9,23 a A
2,5	11,58 a A	8,35 ab AB	6,26 ab B
5,0	5,05 b A	7,78 abc A	5,26 ab A
10,0	4,86 b A	3,63 bc A	5,05 ab A
20,0	4,60 b A	3,36 c A	3,94 b A
CV (%)	36,00		

¹Área abaixo da curva de progresso da mancha angular do algodoeiro.

²Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

³Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

da mancha bacteriana (*X. vesicatoria*) do tomateiro foi de até 70% em relação à testemunha em plantas tratadas com ASM uma única vez, um ou três dias antes da inoculação. No entanto, em cacau, intervalos maiores foram necessários para o desenvolvimento da resistência contra *Verticillium dahliae* e *Crinipellis perniciosa*, 15 e 30 dias antes da inoculação, respectivamente (Resende *et al.*, 2002).

A utilização de 20,0 g i.a./100L (Tabela 2) proporcionou a menor severidade da doença, mas foi fitotóxica ao algodoeiro. Aos 15 dias verificou-se que plantas tratadas com ASM a partir de 5,0 g i.a./100L tiveram a severidade reduzida em relação à testemunha e aos 7 dias a dose de 10,0 g i.a./100L diferiu significativamente da testemunha e não diferiu da maior dosagem.

5.3 Efeito de doses de manutenção do ASM na severidade da mancha angular do algodoeiro

Verificou-se que plantas em que o ASM foi aplicado uma única vez (7 dias antes da inoculação do patógeno - 0 g i.a./100 L água) apresentaram redução significativa da severidade da doença, sendo de 70% em relação às plantas não tratadas com ASM (testemunha), diferindo significativamente dos demais tratamentos. As doses de manutenção do ASM proporcionaram reduções intermediárias da severidade, não diferindo entre si. As doses 5,0 e 2,5 g i.a./100 L água não diferiram significativamente da testemunha (Tabela 3).

Silva *et al.* (2003a) verificaram redução de até 70% da severidade da mancha bacteriana (*X. vesicatoria*) do tomateiro em relação à testemunha em plantas tratadas com ASM uma única vez, um ou três dias antes da inoculação. No entanto, quando foram realizadas três aplicações do ASM, a severidade da mancha bacteriana do tomateiro foi reduzida em média 56, 27% (Silva *et al.*, 2003b). Romero, Kousik e Ritchie (2001) citam vários trabalhos em que plantas

tratadas com indutor de resistência apresentaram maiores produções que plantas não tratadas, na presença de patógenos, mas menores produções na ausência de patógenos.

TABELA 3 – Efeito de doses de manutenção de ASM na severidade (AACPD) da mancha angular do algodoeiro.

Tratamentos	AACPD	Porcentagem de controle em relação à testemunha
0 g i.a./100L de água	26,35 c	70,01
7,5 g i.a./100L de água	54,16 b	38,36
10,0 g i.a./100L de água	59,18 b	32,64
5,0 g i.a./100L de água	62,97 ab	28,33
2,5 g i.a./100L de água	71,54 ab	18,58
Testemunha	87,86 a	-
CV (%)	18,88	

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

- 1) O ASM não teve efeito direto sobre o crescimento de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* até a concentração de 1000 ppm;
- 2) A dose de 20,0 g i.a./100L de água foi fitotóxica ao algodoeiro;
- 3) Não houve diferença significativa entre as épocas de aplicação do ASM (3, 7 e 14 dias antes da inoculação) para as doses de 5,0; 10,0 e 20,0 g i.a./100L água.
- 4) Para a dose 2,5 g i.a./100L água, a melhor época de aplicação foi aos 3 dias antes da inoculação do patógeno;
- 5) Uma aplicação do ASM foi eficiente no controle da mancha angular do algodoeiro, não sendo necessárias dosagens de manutenção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, Oxford, v.52, n.6, p.747-753, Dec., 2003.

CASTRO R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; AZEVEDO, L.A.S. Efeito do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl na proteção contra doenças, incremento de produção e qualidade de frutos em tomate estaqueado. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.492, ago., 2001. (Suplemento).

CASTRO, R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; GUICHERIT, E. Redução na severidade de doenças e incremento da produção e qualidade dos frutos de tomate estaqueado em áreas comerciais através da aplicação do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, p.324, ago., 2000. (Suplemento).

JESUS JUNIOR, W.C.; ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; PEREIRA, J.L.A. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.293, ago., 1999. (Suplemento).

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, 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.

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

LOPES, C.A. Manejo integrado de bactérias fitopatogênicas. In: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. (eds.). *Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças*. Lavras: UFLA, 2001. Cap.4, p.105-123.

MAIA, C.B.; ROMEIRO, R.S.; LUSTOSA, DC. Avaliação de fitotoxidez e efetividade de cibenzolar-s. methyl como indutor de resistência em tomateiro a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, p.324, ago., 2000. (Suplemento).

MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). *Manual de práticas em Fitobacteriologia*. Recife: O autor. 2000. p.115-119.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, London, v.82, p.535-540, Nov., 1998.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.107, n.1, p.19-28, Jan., 2001.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acybenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology*, Oxford, v.51, p.621-628, 2002

ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; JESUS JÚNIOR, W.C.; PEREIRA, J.L.A. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. campestris* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.255, ago., 1999. (Suplemento).

ROMERO, A.M.; KOUSIK, C.S.; RITCHIE, D.F. Resistance to bacterial spot Bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease*, St. Paul, v.85, n.2, p.189-194, Feb., 2001.

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

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R.; CASTRO, A.M.S. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.29, n.2, p.177-181, abr./jun., 2003a.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R. Avaliação comparativa do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* no tomateiro. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.29, n.3, p.244-248, jul./set., 2003b.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.294, ago., 2001a. (Suplemento).

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.294, ago., 2001b. (Suplemento).

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

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, n.3, p.472-489, July, 1995.

VENÂNCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L.; PERES, N.A.R.P. Novos fungicidas. II - famoxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.8, p.59-92, 2000.

CAPÍTULO 4

Atividade das enzimas fenilalanina amônia liases, β -1,3-glucanases e peroxidases e deposição de lignina em plantas de algodão tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e uma rizobactéria do algodoeiro e desafiadas contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

1 RESUMO

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Atividade das enzimas fenilalanina amônia liases, β -1,3-glucanases e peroxidases e deposição de lignina em plantas de algodão tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e uma rizobactéria do algodoeiro e desafiadas contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro. Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Tese – Doutorado em Fitopatologia).*

Para avaliar a resistência induzida por rizobactéria e ASM em plantas de algodão contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, avaliaram-se os efeitos do isolado rizobacteriano L2-1 e do ASM isoladamente e o uso simultâneo destes dois indutores na redução dos sintomas da mancha angular do algodoeiro, bem como determinou-se a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidases (POX) e β -1,3 glucanases, as quais possivelmente estão envolvidas nas respostas de defesa de plantas de algodão a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* e à deposição de lignina. O acibenzolar-S-metil e o isolado L2-1, utilizados isoladamente ou simultaneamente, reduziram significativamente a severidade da mancha angular do algodoeiro, sendo o melhor tratamento para o controle da mancha angular proporcionado pelo acibenzolar-S-metil. Não houve efeito aditivo quando se utilizou o acibenzolar-S-metil simultaneamente com o isolado L2-1. Os resultados das atividades enzimáticas em plantas de algodão revelaram que o ASM proporcionou os maiores aumentos nas atividades de PAL, peroxidases e β -1,3-glucanases e na deposição de lignina, sendo que as maiores atividades de PAL, peroxidases e β -1,3-glucanases ocorreram aos 14 dias após aplicação dos tratamentos. Quanto à aplicação simultânea de ASM e rizobactéria, a atividade das enzimas foi sempre inferior ao tratamento em que o ASM foi aplicado isoladamente.

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

2 ABSTRACT

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Phenylalanine ammonia-lyase, β -1,3 glucanases and peroxidase activities and lignin deposition in cotton plants treated with acibenzolar-S-methyl (ASM) and a cotton rhizobacteria and challenged against *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria and acibenzolar-S-methyl (ASM) to control of cotton bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*). Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Thesis - Doctorate in Phytopathology).*

To evaluate the resistance induced by rhizobacteria and ASM in cotton against *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, was evaluated the effects of L2-1 strain and ASM separately and simultaneously, using both inducers in symptoms reduction of cotton bacterial blight, as well as the determination of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidases and β -1,3-glucanases activities, which possibly are involved in responses of defense of cotton to *X. axonopodis* pv. *malvacearum* and lignin deposition. The ASM and L2-1 strain used separately or simultaneously, they reduced significantly the cotton bacterial blight symptoms, and the best treatment for bacterial blight control was provided by ASM. There was no additive effect when ASM was used simultaneously with L2-1. The results of the enzymatic activities in cotton plants revealed that ASM provided the highest increase in the activities of PAL, peroxidases and β -1,3-glucanases, and in lignin deposition, after 14 days of the treatment application. When, ASM and rhizobacteria were applied simultaneously, enzyme activities were always lower than those of ASM applied separately.

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

3 INTRODUÇÃO

A resistência induzida é definida como o aumento das respostas de defesa da planta a um amplo espectro de patógenos e pragas ativada por um estímulo apropriado (Sticher *et al.*, 1997; van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Knoester *et al.*, 1999; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Assim, ela depende do reconhecimento de um invasor e subseqüentes eventos de transdução de sinal que levam à ativação das defesas (Mauch-Mani e Métraux, 1998).

A resistência sistêmica induzida por patógenos é denominada resistência sistêmica adquirida (SAR) (Ryals *et al.*, 1996). Tipicamente, SAR é associada com a reação de hipersensibilidade (HR) e caracterizada pelo aumento inicial no ácido salicílico (AS) sintetizado endogenamente e concomitante ativação de genes codificadores de PR proteínas (Ryals *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 1996; van Loon, 1997). SAR também pode ser induzida por vários químicos, dentre os quais o acibenzolar-S-metil (ASM) é o ativador de resistência melhor estudado e o primeiro produto comercial (Venâncio *et al.*, 2000). Este produto é translocado sistemicamente em plantas e pode imitar o AS na via de sinalização natural de SAR, induzindo o mesmo espectro de resistência e o mesmo grupo de marcadores moleculares (Oostendorp *et al.*, 2001). O aumento da atividade de enzimas envolvidas nas respostas de defesa tem sido relatado em plantas tratadas com ASM (Bausal, Soyly e Soyly, 2003; Silva, 2002; Resende *et al.*, 2002; Colson-Hanks e Deverall, 2000). Enzimas oxidativas como peroxidases e polifenol oxidases catalisam a formação de lignina e outros fenóis oxidados, que contribuem para a formação de barreiras de defesa para o reforço da estrutura da célula. Outras enzimas, como a tirosina amônia liase (TAL) e a fenilalanina amônia liase (PAL), estão envolvidas na biossíntese de fitoalexinas e compostos fenólicos. Quitinases e β -1,3-glucanases têm sido intensivamente estudadas pelo seu acúmulo em tecidos de plantas infectados e suas funções em reações de

defesa de plantas em diferentes interações microrganismo-planta (van Loon, 1997).

Outra forma de resistência induzida por certos isolados de bactérias da rizosfera é chamada de resistência sistêmica induzida (ISR) (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998). A ISR tem sido demonstrada em feijão, cravo, pepino, rabanete, fumo, tomate e na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sendo efetiva contra um amplo espectro de patógenos de planta, incluindo fungos, bactérias e vírus (van Loon, Bakker e Pieterse, 1998; Silva *et al.* 2001a; 2001b; 2001c; 2004). Estudos têm demonstrado que ao contrário de SAR, a ISR é independente do acúmulo de AS e da ativação de genes PR (Pieterse *et al.*, 1996) e que a transdução de sinal que leva a ISR requer a resposta ao ácido jasmônico e ao etileno e, similarmente a SAR, é dependente da proteína NPR1 (Pieterse *et al.*, 1998). Van Wees *et al.* (2000) investigaram possíveis interações entre as duas vias. Curiosamente, a ativação simultânea destas vias resultou em um efeito aditivo no nível de proteção induzida contra o isolado DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* (Pst DC3000). Apesar dos avanços sobre os mecanismos envolvidos na ISR, a via pela qual ela é induzida não está completamente decifrada e os seus marcadores ainda não foram identificados. No entanto, o aumento nas atividades de fenilalanina amônia liase, peroxidases, polifenol oxidases e lipoxigenases vem sendo demonstrado em plantas de tomate, pepino e *Festuca aurundinacea*, após o tratamento com PGPR (Kilic-Ekici e Yuen, 2004; Silva *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2000).

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do isolado rizobacteriano L2-1 e do ASM isoladamente e em conjunto na redução dos sintomas da mancha angular do algodoeiro, bem como determinar a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidases (POX) e β -1,3 glucanase, as quais possivelmente estão envolvidas nas respostas de defesa de plântulas de algodão a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* e à deposição de lignina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem, isolamento e preservação do patógeno

O isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) foi obtido de folhas de algodoeiro apresentando lesões típicas da mancha angular, coletadas e herborizadas na região produtora do Estado de Mato Grosso. Posteriormente, procedeu-se o isolamento no Laboratório de Bacteriologia do DFP/UFLA, utilizando-se o meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e o método de estrias paralelas e posterior incubação por 48 h a 28 °C. Em seguida, colônias isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio 523 inclinado. A patogenicidade do isolado foi constatada pela inoculação, pulverizando-se a face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL. As plântulas foram mantidas por 24h antes e depois da inoculação em câmara úmida, sendo em seguida levadas para casa-de-vegetação. Após o aparecimento dos sintomas, o patógeno foi reisolado conforme anteriormente citado. A preservação do isolado durante o decorrer do experimento foi em peptona glicerol a -80 °C (Lazo e Gabriel, 1987) e em folhas herborizadas.

4.2 Origem e preservação do isolado de rizobactéria

O isolado de rizobactéria L2-1, previamente selecionado (Capítulo 2), obtido de plantas de algodão provenientes da região de Lavras, Minas Gerais, foi preservado em peptona glicerol a -80 °C (Lazo e Gabriel, 1987). Para o uso experimental, a rizobactéria foi transferida para o meio 523 (Kado e Heskett, 1970) pelo método de estrias paralelas e incubada por 48 h a 28 °C. Para o preparo da suspensão bacteriana, as colônias foram diluídas em água de torneira e a concentração, ajustada para $A_{600} = 0,25$.

4.3 Efeito do ASM e rizobactérias sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação

Foi realizada a comparação entre a resistência induzida por rizobactéria e a induzida por ASM, bem como o uso simultâneo destes dois indutores. Para avaliar o efeito do ASM e do isolado L2-1, selecionado por reduzir significativamente os sintomas da doença (Capítulo 2), sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro, sementes de algodão da cultivar CNPA Ita 90, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, foram semeadas em vasos de 1,5 kg de capacidade contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1) previamente fumigada com brometo de metila. Foram utilizados os seguintes tratamentos:

- 1) Aplicação de ASM;
- 2) Aplicação do isolado L2-1;
- 3) Aplicação de ASM e do isolado L2-1;
- 4) Testemunha inoculada;
- 5) Testemunha absoluta.

O ASM foi utilizado na dose de 10,0 g do ingrediente ativo/100 L de água (Capítulo 3), enquanto o isolado L2-1 (Capítulo 2) foi aplicado pela irrigação do solo com 100 mL de suspensão bacteriana, na concentração $A_{600} = 0,25$. Todos os tratamentos foram aplicados 7 dias antes da inoculação de Xam, a qual foi realizada 36 dias após o plantio (item 4.3, Capítulo 2).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 5 tratamentos e 4 repetições (6 plantas/repetição). A avaliação da severidade da mancha angular foi realizada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno, através da escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977) adaptada (Tabela 1).

TABELA 1 – Escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977) adaptada para severidade da mancha angular do algodoeiro.

Nota	Severidade
0	0% de folha lesionada
1	de 1 a 25% de folha lesionada
2	de 26 a 50% de folha lesionada
3	de 51 a 75% de folha lesionada
4	acima de 76% de folha lesionada

4.4 Atividade das enzimas envolvidas nas respostas de defesa de plantas de algodão

Foi determinada a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidases (POX) e β -1,3 glucanases, as quais possivelmente estão envolvidas nas respostas de defesa de plantas de algodão a *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, ativadas por ASM, bem como à deposição de lignina. Tal atividade foi verificada também em plantas tratadas com rizobactéria e rizobactéria + ASM. Para a determinação das atividades enzimáticas e lignina, foram utilizados os seguintes tratamentos:

- 1) Aplicação de ASM seguida da inoculação do patógeno;
- 2) Aplicação de ASM sem a inoculação do patógeno;
- 3) Aplicação de rizobactéria seguida da inoculação do patógeno;
- 4) Aplicação de rizobactéria sem a inoculação do patógeno;
- 5) Aplicação de rizobactéria e ASM seguida da inoculação do patógeno;
- 6) Aplicação de rizobactéria e ASM sem a inoculação do patógeno;
- 7) Inoculação do patógeno sem aplicação de ASM e rizobactérias;
- 8) Testemunha absoluta.

O ASM foi utilizado na dose de 10,0 g do ingrediente ativo/100 L de água (Capítulo 3) e o isolado L2-1 de rizobactéria, previamente selecionado (Capítulo 2), foi aplicado pela irrigação do solo com 100 mL de suspensão bacteriana, na concentração $A_{600} = 0,25$. Todos os tratamentos foram aplicados 7 dias antes da inoculação de Xam, realizada 36 dias após o plantio (item 4.3, Capítulo 2). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 8 tratamentos e 4 repetições.

4.4.1 Preparo das amostras para determinação das atividades das enzimas fenilalanina amônia liase e β -1,3 glucanase

As amostras para extração das enzimas fenilalanina amônia liases e β -1,3 glucanases foram coletadas aos 3 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos e aos 3 e 7 dias após a inoculação do patógeno para todos os tratamentos. Cada amostra coletada foi pesada, acondicionada em saco plástico devidamente identificado, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o preparo dos extratos, cada amostra congelada foi macerada individualmente com o auxílio de um pistilo em almofariz de porcelana sobre o gelo, homogeneizada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 4,8, na proporção de 1 g matéria fresca da amostra para 3 mL de tampão, durante 20 minutos. O extrato homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g por 20 minutos e o sobrenadante, coletado em tubos plásticos, armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise posterior.

4.4.2 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976) ajustando-se uma curva padrão, determinada previamente com o uso de soluções com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina,

correlacionando-se a concentração de proteínas com leituras de absorbância, em espectrofotômetro a 595 nm. Os dados foram expressos em mg de proteínas/ mL do extrato total.

4.4.3 Ensaio enzimáticos

4.4.3.1 Fenilalanina amônia-liases (PAL) (EC. 4.3.1.5)

Para análise de PAL, foram utilizados 100 μ L do extrato + 50 μ L de L-fenilalanina (6 μ M) + 850 μ L de solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,4. A mistura reativa foi colocada em banho-Maria a 37 °C por 70 minutos. Após este período foram adicionados 50 μ L de ácido clorídrico 50 N para paralisar a reação. A atividade de PAL foi determinada de acordo com a metodologia de Beaudoin-Eagan e Thorpe (1985). A quantidade de ácido trans-cinâmico formado por fenilalanina foi medida em espectrofotômetro ao comprimento (λ) de onda 290 nm (U.V.). Como amostra padrão foi utilizada PAL de *Rhodotorula glutinis* (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) e o resultado foi expresso como unidade da atividade de PAL (pKat) por mg de proteína.

4.4.3.2 β -1,3 glucanases (EC. 3.2.1.6)

A atividade de β -1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada a partir da reação enzimática da laminarina. A mistura da reação contendo 50 μ L do tampão de extração, 200 μ L do extrato protéico e 250 μ L de laminarina (4,0 mg/mL) (Xue, Charest e Jabaji-hare, 1998) foi incubada a 60 °C por 1 hora. A seguir foi acrescentada solução contendo tartarato de sódio e potássio e sulfato de cobre para detecção do potencial redutor da glicose, produzindo o complexo cobre – tartarato e ácido glicólico. A mistura foi aquecida a 100 °C, por 20 minutos, para a paralização da atividade

hidrolítica. A absorvância a 520 nm foi determinada após o resfriamento da amostra. O resultado foi expresso como unidade da atividade de β -1,3-glucanases (nKat) por mg de proteína.

4.4.3.3 Peroxidases (POX) (EC. 1.11.1.7)

Para o preparo dos extratos, cada amostra congelada foi macerada individualmente com o auxílio de um pistilo em almofariz de porcelana sobre o gelo e homogeneizada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, na proporção de 1 g de matéria fresca da amostra para 3 mL de tampão, durante 10 minutos. O extrato homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g por 20 minutos e o sobrenadante coletado em tubos plásticos e armazenados a -20 °C. Para determinação da atividade de peroxidases foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991). Como doador de elétrons foi utilizado o guaiacol e como receptor, o peróxido de hidrogênio. A reação, catalisada pela peroxidase, produziu o composto colorido 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona. Uma alíquota de 0,025mL do extrato bruto foi adicionada a 0,5mL de guaiacol 0,02M e a 0,5mL de peróxido de hidrogênio 0,06M, em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8, contendo 0,1 mM de EDTA, até o volume final de 2mL. A mistura foi incubada a 30 °C, por 10 minutos, e em seguida teve sua absorvância medida a 480nm. A variação de 1,0 unidade de absorvância por minuto foi assumida como sendo 1,0 unidade de atividade peroxidásica (1UA).

As amostras foram analisadas também por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida. A eletroforese das amostras foi realizada de acordo com Cavalcanti (2002), baseado na metodologia descrita por Davis (1964) e Ornstein (1964). A preparação do gel e a corrida eletroforética foram conduzidas no sistema "Mighty Small II", modelo SE250-10A-75 (Hoefer Pharmacia Biotech

Inc.). O gel de aplicação (1mm de espessura) continha 3,5% de acrilamida, preparada em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e o gel de separação (1mm de espessura), na concentração de 10,0% de acrilamida, preparada em tampão Tris-HCl 3,0M, pH 8,8. Os extratos totais das amostras foram diluídos em tampão Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 sem SDS e sem β -mercaptoetanol. As amostras foram, então, aplicadas no gel e a corrida desenvolvida a 20mA por, aproximadamente, 3 horas.

Ao fim da corrida eletroforética, o gel foi mergulhado em 30mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,2, com 3-amino-9-etilcarbazole 0,01%, peróxido de hidrogênio 0,03% e guaiacol 0,2%. Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada. Esse tipo de revelação teve por objetivo revelar as bandas protéicas com atividade peroxidásica, pela metodologia de Towbin *et al.* (1979), adaptada por Cavalcanti (2002).

4.4.4 Lignina

Para a determinação da deposição de lignina, as amostras foram coletadas aos 7 dias após a inoculação do patógeno (14 dias após a aplicação dos tratamentos) para todos os tratamentos. Cada amostra coletada foi pesada, acondicionada em saco plástico devidamente identificado, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -20 °C. O conteúdo de lignina foi determinado como descrito por Stadnik (1999), pelo ensaio com ácido tioglicólico (TGA) (Monties, 1989), em que 0,2 g de tecido foliar foram incubados 4 vezes sucessivamente com metanol por 48 horas; em seguida os tecidos foram secos por 48 horas a 60°C e homogeneizados em almofariz. Uma mistura de ácido tioglicólico e ácido clorídrico 2N (1: 10) foi adicionada à amostra de tecidos homogeneizados (5mL da mistura para 15 mg de tecidos) por

4 horas a 100°C. Uma lavagem com água foi realizada em seguida e o ácido lignotioglicolítico foi extraído a partir do precipitado com 5 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,5N) por 18 horas. As amostras foram então centrifugadas a 8.000 g por 15 minutos, acidificadas com HCl concentrado e incubadas a 4°C por 4 horas. Em seguida uma nova centrifugação foi realizada e o precipitado, ressuspenso em NaOH 0,5N, e a absorvância dos derivados de TGA foi determinada a 280_{nm}.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do ASM e rizobactérias sobre a severidade da mancha angular do algodoeiro em casa-de-vegetação

Os resultados apresentados na Tabela 2 revelam que todos os tratamentos utilizados diferiram significativamente da testemunha inoculada. As plantas tratadas com o ASM proporcionaram maior redução da severidade da mancha angular, com 57,81% de controle em relação à testemunha, diferindo significativamente das plantas tratadas com o isolado L2-1, que apresentaram 25,48% de controle em relação à testemunha.

TABELA 2 – Efeito do ASM e do isolado rizobacteriano L2-1, aplicados juntos e isoladamente sobre a severidade (AACPD) da mancha angular do algodoeiro.

Tratamentos	AACPD	Porcentagem de controle em relação à testemunha
Testemunha absoluta	0 d ¹	100
Acibenzolar-S-metil (ASM)	54,65 c	57,81
ASM + Isolado L2-1	66,37 bc	48,76
Isolado L2-1	96,53 b	25,48
Testemunha inoculada	129,53 a	-
CV (%)	19,58	

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em estudos em que a ISR mediada por rizobactérias e SAR induzida por patógeno foram comparadas diretamente, o nível de supressão da doença foi similar. Em rabanete, Hoffland, Hakulinen e van Pelt (1996) verificaram que a proteção induzida pelo isolado WCS417 de *Pseudomonas fluorescens* foi similar à induzida pelo patógeno *P. syringae* pv. *tomato*.

O tratamento em que foram aplicados o ASM e o isolado L2-1 simultaneamente foi intermediário, apresentando 48,76% de controle em relação à testemunha, não diferindo significativamente dos tratamentos com ASM e com isolado L2-1 (Tabela 2). Estes resultados diferiram daqueles encontrados por Van Wees *et al.* (2000), em que a ativação simultânea de SAR e ISR resultou em efeito aditivo no nível de proteção induzida contra o isolado DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato*. Uma possível explicação para estes resultados seria o fato de que, com a indução de resistência, há gasto de energia para a planta e, assim, a ativação simultânea das duas vias acarretaria na redução da proteção dada pela via de SAR.

5.2 Determinação de proteínas solúveis totais

Quando se analisou o conteúdo de proteínas solúveis totais nos extratos de plantas de algodão destinados à análise das enzimas fenilalanina amônia liase e β -1,3-glucanase, observou-se que a maior concentração de proteínas totais em todos os tratamentos ocorreu na primeira coleta, realizada 3 dias após a aplicação dos mesmos, não havendo diferença significativa entre eles (Figura 1). Na segunda coleta (7 dias após a aplicação dos tratamentos), houve uma redução do conteúdo de proteínas em todos os tratamentos, sendo que as plantas tratadas com a rizobactéria (L2-1) apresentaram maior conteúdo de proteínas totais (Figura 1). Na terceira coleta, realizada 3 dias após a inoculação do patógeno (10

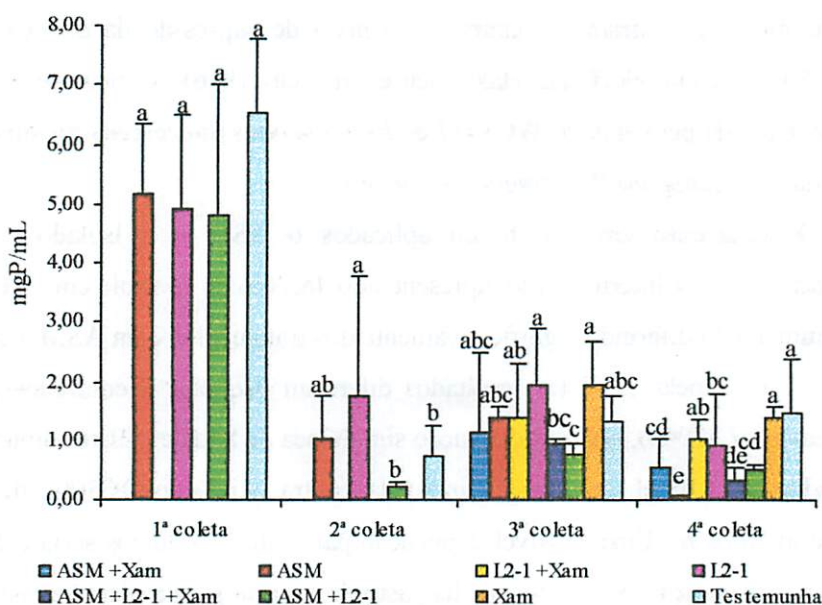


FIGURA 1 – Dosagem de proteínas solúveis totais determinadas em amostras de plantas de algodão, extraídas com tampão tris-HCl (PAL e β -1,3-glucanases) aos 3 (1ª coleta), 7 (2ª coleta), 10 (3ª coleta) e 14 (4ª coleta) dias após os tratamentos com acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha, seguidos ou não da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). Dentro de cada coleta, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

dias após aplicação dos tratamentos), o maior conteúdo de proteínas totais ocorreu nas plantas não inoculadas, tratadas com a rizobactéria (L2-1), e nas plantas da testemunha inoculada (Xam), e os menores valores nas plantas não

inoculadas que receberam o tratamento simultâneo com o acibenzolar-S-metil e com o isolado L2-1 (Figura 1).

Na quarta coleta, realizada 7 dias após a inoculação do patógeno (14 dias após a aplicação dos tratamentos), os maiores valores de proteínas solúveis totais ocorreram nas plantas testemunhas, inoculadas e não inoculadas, e os menores valores nas plantas não inoculadas, tratadas com o acibenzolar-S-metil (Figura 1).

Quando se analisou o conteúdo de proteínas solúveis totais nos extratos de plantas de algodão destinados à análise de peroxidases, observou-se que na primeira coleta, realizada 3 dias após a aplicação dos tratamentos, as plantas tratadas com a rizobactéria (L2-1) apresentaram os maiores valores de proteínas totais e aquelas tratadas com o acibenzolar-S-metil, os menores valores (Figura 2). Na segunda coleta (7 dias após aplicação dos tratamentos), não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2). Já na terceira coleta, realizada 3 dias após a inoculação de Xam, os maiores valores de proteínas totais ocorreram no tratamento com acibenzolar-S-metil, seguido da inoculação de Xam, e os menores, nas plantas da testemunha inoculada (Figura 2). Na quarta coleta, as plantas não inoculadas que receberam o tratamento simultâneo com o acibenzolar-S-metil e com a rizobactéria apresentaram o maior conteúdo de proteínas totais e as plantas inoculadas que receberam os tratamentos isolados do ASM e da rizobactéria, os menores conteúdos (Figura 2).

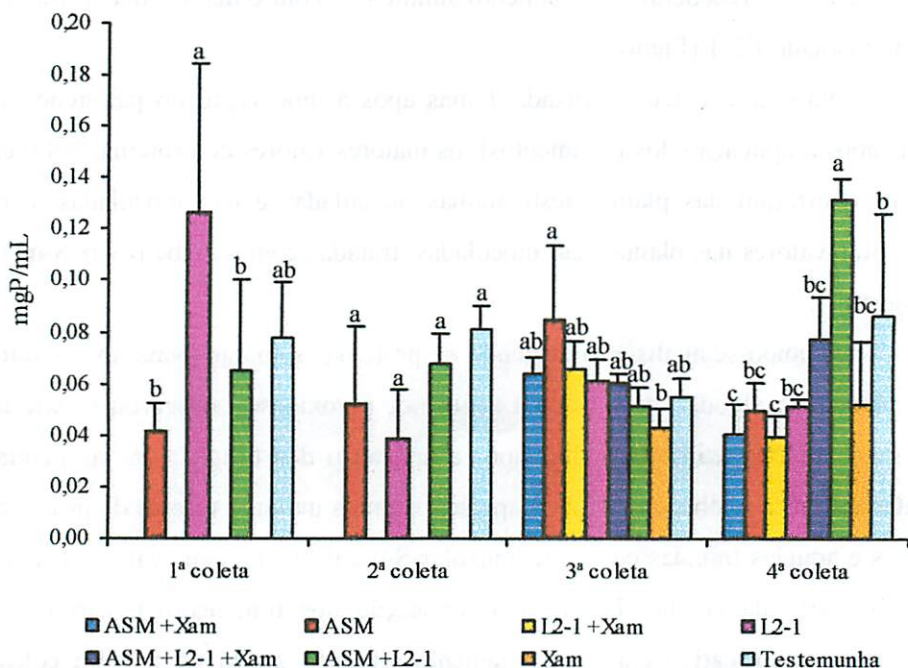


FIGURA 2 – Dosagem de proteínas solúveis totais determinadas em amostras de plantas de algodão, extraídas com tampão acetato de sódio (POX) aos 3 (1ª coleta), 7 (2ª coleta), 10 (3ª coleta) e 14 (4ª coleta) dias após os tratamentos com acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha, seguidos ou não da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). Dentro de cada coleta, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

5.3 Atividade das enzimas envolvidas nas respostas de defesa de plantas de algodão

5.3.1 Fenilalanina amônia liase (PAL)

As plantas que receberam o tratamento isolado e simultâneo com ASM e rizobactéria apresentaram maiores atividades da PAL 14 dias após a aplicação dos tratamentos (sete dias após a inoculação de Xam) (Figura 3). Todos os tratamentos (plantas inoculadas e não inoculadas) apresentaram um aumento na atividade da PAL, com exceção da testemunha absoluta (Figura 4). Chen *et al.* (2000) verificaram que as plantas de pepino tratadas com os isolados 13 e 63-28 de *Pseudomonas* apresentaram maior atividade desta enzima dois dias após aplicação dos tratamentos.

Embora a atividade máxima da PAL tenha ocorrido apenas aos 14 dias após a aplicação do ASM (Figura 3), verificou-se que aos 3 dias após aplicação dos tratamentos, as plantas tratadas com ASM (isolado e simultaneamente com a rizobactéria) apresentaram maior atividade da PAL do que nos demais tratamentos (Figura 4). No entanto, esta atividade diminuiu aos 7 e 10 dias e aumentou aos 14 dias (Figura 4). Smit e Dubery (1997) verificaram que quando tecidos do hipocótilo de algodão foram tratados com elicitor lipopolissacarídeo-proteína de *Verticillium dahliae*, a máxima atividade da PAL ocorreu 4 h após a elicitação em cultivares resistentes e 11 h em susceptíveis, sendo que a atividade desta enzima diminuiu e estabilizou-se após atingir o máximo, mas nunca retornou aos valores da testemunha.

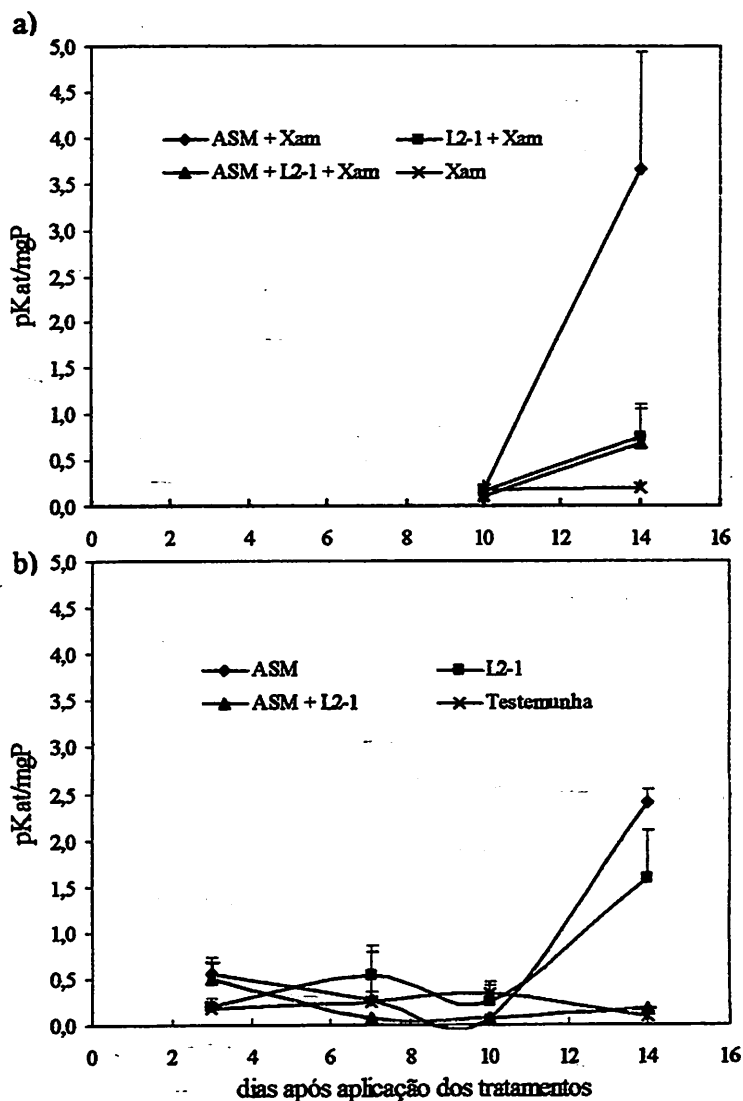


FIGURA 3 – Atividade de fenilalanina amônia liase determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha seguidos (a) ou não (b) da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). As barras representam o desvio padrão.

A atividade da PAL entre os tratamentos analisados variou de 0,065 pKat/mgP (tratamento simultâneo com ASM e a rizobactéria, 7 dias após aplicação dos tratamentos) a 3,657 pKat/mgP (tratamento com ASM, 7 dias após inoculação do patógeno) (Figura 4). Em quase todos os tratamentos a atividade foi maior aos 7 dias após inoculação do patógeno, ou seja, 14 dias após a aplicação dos tratamentos, com exceção das plantas não inoculadas e tratadas simultaneamente com o ASM e a rizobactéria (Figura 4). A atividade da PAL, neste tratamento, foi sempre menor do que naqueles em que o ASM e a rizobactéria foram aplicados isoladamente. De uma maneira geral, a inoculação do patógeno aumentou a atividade da PAL nos tratamentos estudados, exceção feita às plantas tratadas com a rizobactéria, cujas plantas não inoculadas apresentaram maior atividade do que as plantas inoculadas. Resultados semelhantes foram observados por Chen *et al.* (2000), em que plantas de pepino tratadas com os isolados 13 e 63-28 de *Pseudomonas* tiveram inicialmente altos níveis de atividade da PAL, mas quando foram inoculadas com *Pythium aphanidermatum*, os níveis foram menores em comparação com os demais tratamentos. Segundo estes autores, a indução inicial da PAL por rizobactérias pode ter resultado na ativação de defesas, mas a inoculação subsequente do patógeno não induz maiores níveis da PAL. Silva *et al.* (2004) verificaram que a microbiolização das sementes de tomate com rizobactérias aumentou a atividade da PAL e que, após a inoculação do patógeno, não foram observadas mudanças na atividade dessa enzima em relação à testemunha. Comparando o conteúdo de proteínas solúveis totais presente nos extratos e a atividade da enzima, verificou-se que na primeira coleta, em que houve pouca atividade da PAL (Figura 4), foram encontrados os maiores valores de proteínas solúveis totais (Figura 1). Na quarta coleta um perfil semelhante pode ser observado nas plantas que receberam o tratamento com ASM, as quais tiveram os menores valores de

proteínas solúveis totais (Figura 1), no entanto apresentaram as maiores atividades da enzima (Figura 4).

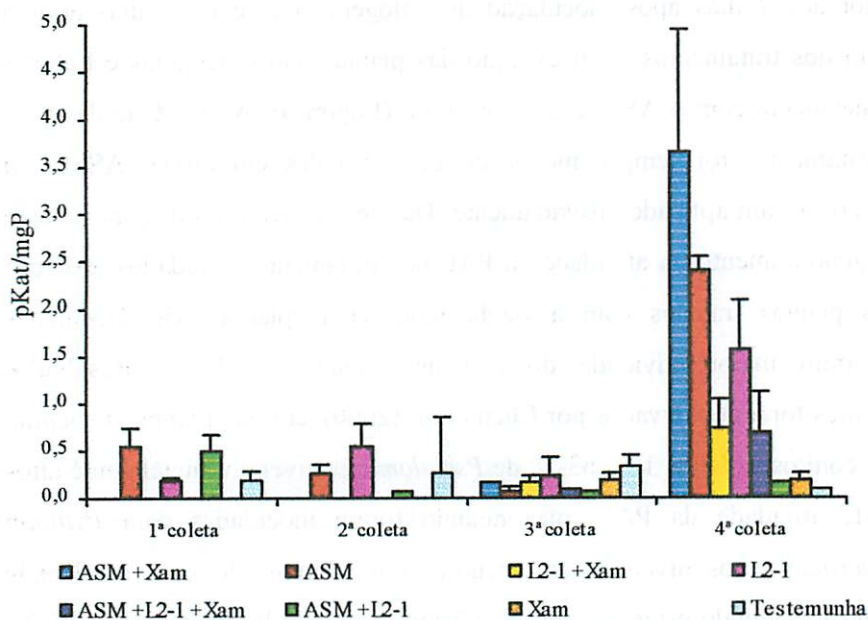


FIGURA 4 – Atividade de fenilalanina amônia liase determinada em amostras de plantas de algodão, aos 3 (1ª coleta), 7 (2ª coleta), 10 (3ª coleta) e 14 (4ª coleta) dias após os tratamentos com acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha, seguidos ou não da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

5.3.2 β -1,3-Glucanase

Na primeira coleta, realizada três dias após a aplicação dos tratamentos, a atividade da β -1,3-glucanase foi similar em todos os tratamentos (Figura 5). Aos 7 dias após aplicação dos tratamentos, houve um aumento na atividade da β -1,3-glucanase comparando-se com a coleta anterior (Figura 5), sendo que a maior atividade ocorreu nas plantas tratadas com ASM + L2-1 (0,576 nKat/mgP), seguido do uso isolado da rizobactéria (0,400 nKat/mgP) e do ASM (0,224 nKat/mgP) (Figura 5).

Após a inoculação de Xam, verificou-se um aumento na atividade da β -1,3-glucanase nas plantas inoculadas e tratadas com ASM (0,794 nKat/mgP) em relação às plantas tratadas com ASM e não inoculadas (0,130 nKat/mgP). Quanto ao tratamento com a rizobactéria, verificou-se maior atividade da β -1,3-glucanase (0,353 nKat/mgP) nas plantas inoculadas do que nas não inoculadas (0,231 nKat/mgP), porém não houve aumento na atividade enzimática. Em plantas tratadas simultaneamente com ASM e rizobactéria, as inoculadas apresentaram menor atividade (0,182 nKat/mgP) do que as não inoculadas (0,236 nKat/mgP). Além disso, verificou-se uma redução na atividade enzimática. A testemunha inoculada apresentou a menor atividade desta enzima (0,042 nKat/mgP).

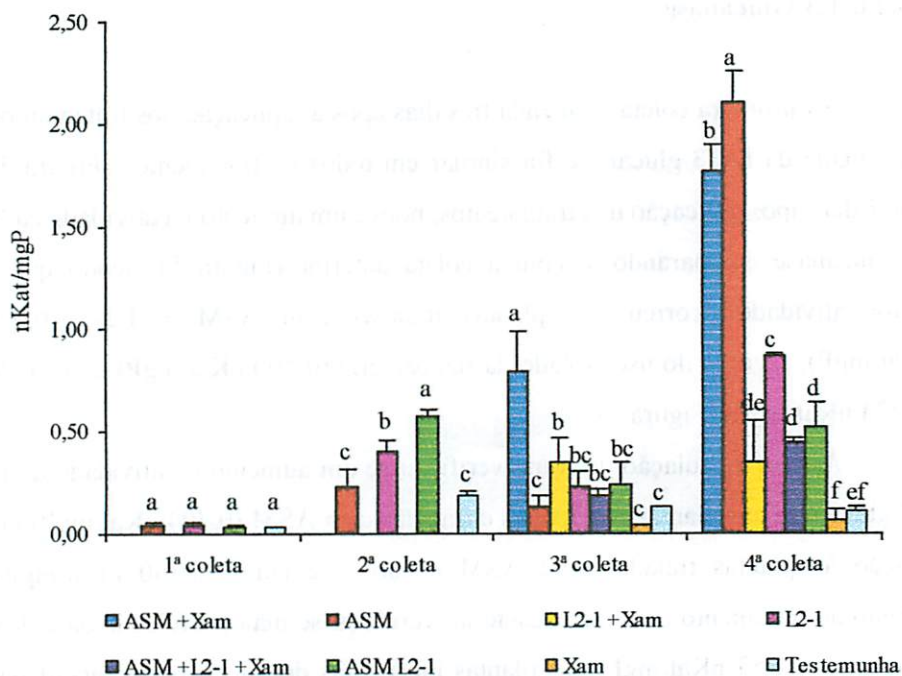


FIGURA 5 – Atividade de β -1,3-glucanases determinada em amostras de plantas de algodão, aos 3 (1ª coleta), 7 (2ª coleta), 10 (3ª coleta) e 14 (4ª coleta) dias após os tratamentos com acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha, seguidos ou não da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). Dentro de cada coleta, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

Aos 7 dias após a inoculação do patógeno, houve um aumento na atividade de β -1,3-glucanase em todas as plantas tratadas, exceto nas plantas testemunhas (Figura 5). Entretanto, plantas tratadas e inoculadas com o patógeno

apresentaram atividades de β -1,3-glucanase menores do que as não inoculadas. Em trabalho realizado por Halfeld-Vieira (2002), a utilização de um agente de biocontrole do filoplano (UFV-IEA) em plantas de tomate não teve efeito na atividade da β -1,3-glucanase, mesmo em plantas inoculadas com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Comparando-se a atividade enzimática com o conteúdo de proteínas solúveis totais, verificou-se que de forma semelhante ao ocorrido com a PAL, as menores atividades de β -1,3-glucanase ocorreram na primeira coleta (Figura 5), realizada 3 dias após a aplicação dos tratamentos, quando foram encontrados os maiores valores de proteínas (Figura 1), as maiores atividades da enzima ocorreram na quarta coleta (Figura 5), quando foram encontrados os menores valores de proteínas (Figura 1).

As plantas tratadas com ASM apresentaram o máximo da atividade de β -1,3-glucanases aos 14 dias após aplicação dos tratamentos (Figura 6). Colson-Hanks e Deverall (2000) verificaram alta atividade de β -1,3-glucanases cinco dias após a aplicação de ASM em algodão. Já as plantas tratadas com a rizobactéria tiveram um pico aos 7 dias após a aplicação e aumentaram novamente aos 14 dias (Figura 6). No uso simultâneo do ASM e da rizobactéria, a atividade máxima ocorreu aos 7 dias, decresceu aos 10 dias e voltou a subir aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos (Figura 6).

Os estudos realizados em *Arabidopsis* têm demonstrado que ao contrário de SAR induzida pelo patógeno, a ISR mediada pelo isolado WCS417r de *P. fluorescens* é independente da ativação do gene que codifica PR-proteínas (Pieterse *et al.*, 1996); no entanto, neste trabalho verificou-se que o tratamento com a rizobactéria aumentou a atividade de β -1,3-glucanases aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos, diferindo significativamente da testemunha (Figura 5).

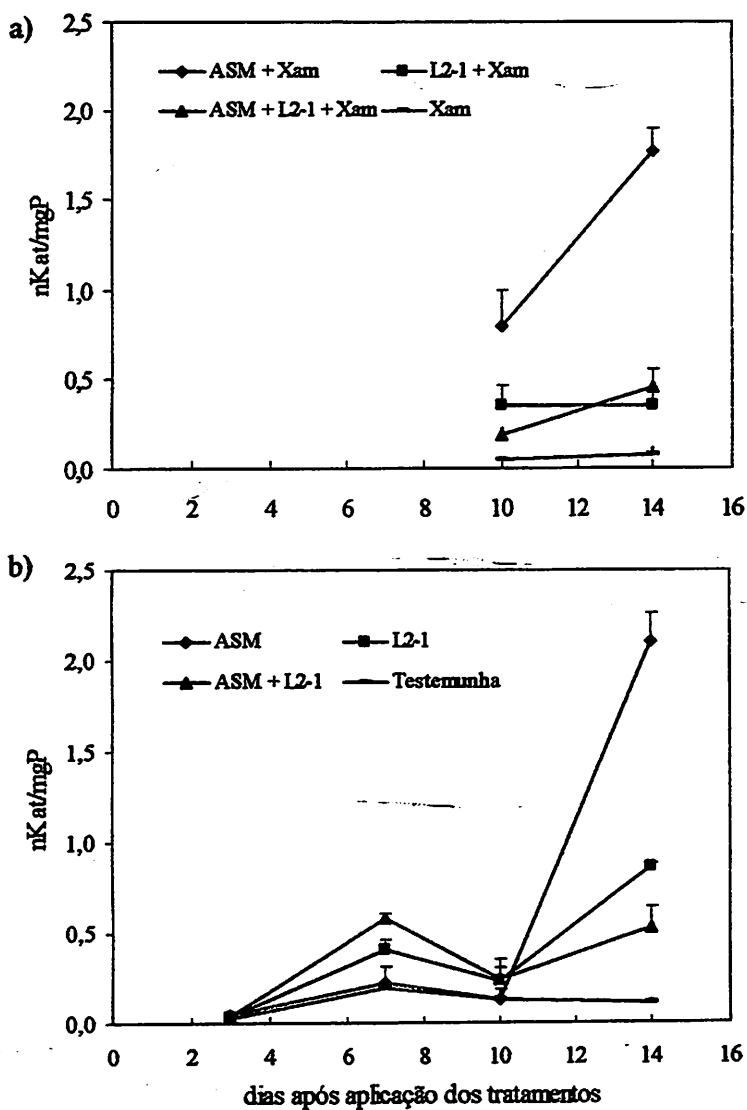


FIGURA 6 – Atividade de β -1,3-glucanases determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha seguidos (a) ou não (b) da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). As barras representam o desvio padrão.

5.3.3 Peroxidases (POX)

A atividade de peroxidases 3 dias após a aplicação dos tratamentos (primeira coleta) foi maior nas plantas tratadas com ASM (583,917 mgP/min) em relação aos demais tratamentos (Figura 7). Na segunda coleta, realizada sete dias após aplicação dos tratamentos, houve redução na atividade de peroxidases nas plantas tratadas com ASM (232,737 mgP/min) e aumento no tratamento com a rizobactéria (255,687 mgP/min), sendo este o único tratamento que diferiu significativamente da testemunha (Figura 7).

A inoculação com Xam foi realizada 7 dias após aplicação dos tratamentos. Verificou-se que, aos 3 dias após a inoculação do patógeno, a atividade de peroxidases foi maior nos tratamentos inoculados com Xam (ASM + Xam, L2-1 + Xam e Xam) do que os não inoculados (ASM, L2-1 e testemunha absoluta), com exceção dos tratamentos em que foram aplicados o ASM e a rizobactéria simultaneamente (Figura 7). A aplicação isolada e simultânea do ASM com a rizobactéria resultou em maior atividade da POX, comparada com a aplicação isolada da rizobactéria (L2-1) (Figura 7). Na quarta coleta, realizada 14 dias após aplicação dos tratamentos, verificou-se que maior atividade de peroxidases foi obtida em plantas tratadas com ASM e posteriormente inoculadas com patógeno (450,637 mgP/min) (Figura 7), as menores atividades obtidas nos tratamentos não inoculados, aos quais se aplicou a rizobactéria isolada e simultaneamente com o ASM (101,083 mgP/min, 36,113 mgP/min respectivamente), e na testemunha absoluta (25,633 mgP/min) (Figura 7).

De modo geral, os tratamentos com o uso isolado de ASM apresentaram as maiores atividades de peroxidases, variando de 223,737 a 583,917 mgP/min, ocorrendo atividade máxima aos 3 dias após a aplicação (Figura 8). Em plantas

de *Festuca aurundinacea*, a maior atividade de peroxidases ocorreu 5 dias após a aplicação de ASM (Kilic-Ekici e Yuen; 2004).

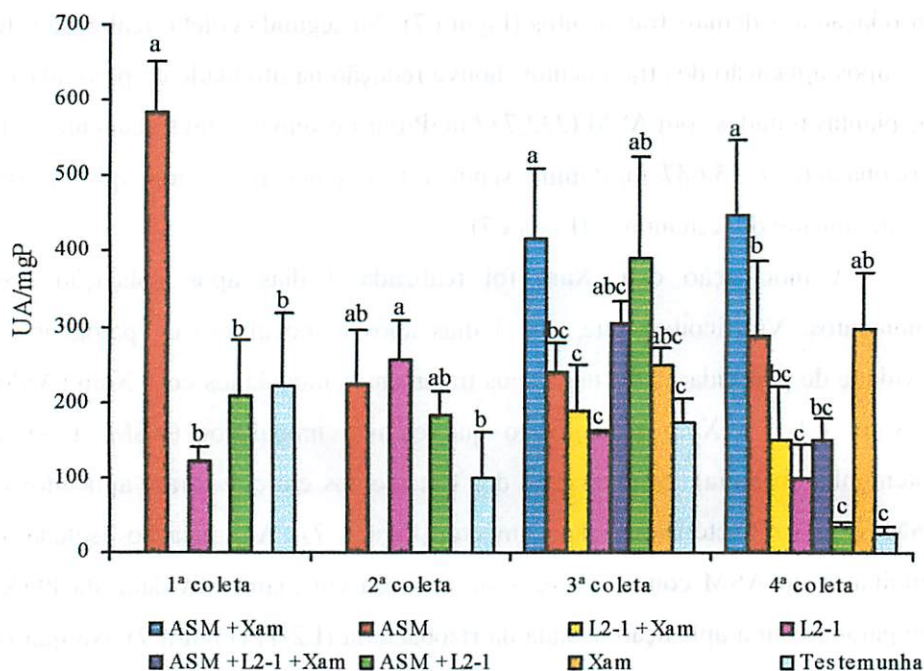


FIGURA 7 – Atividade de peroxidases determinada em amostras de plantas de algodão, aos 3 (1ª coleta), 7 (2ª coleta), 10 (3ª coleta) e 14 (4ª coleta) dias após os tratamentos com acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha, seguidos ou não da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). Dentro de cada coleta, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

Baysal, Soylu e Soylu (2003) verificaram que plantas de tomate tratadas com ASM e inoculadas 3 dias depois com *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) tiveram a atividade de peroxidases significativamente maior do que os outros três tratamentos (ASM, água + Cmm e água). A atividade de peroxidases foi aproximadamente 3 vezes maior em folhas de plantas de tomate tratadas com ASM do que na testemunha não inoculada aos 5 dias após a inoculação do patógeno (Baysal, Soylu e Soylu, 2003). Plantas de tomate tratadas com ASM e não inoculadas com a bactéria apresentaram atividade de peroxidases tão alta quanto aquelas tratadas com ASM e inoculadas. Os tratamentos inoculados com o patógeno apresentaram sempre atividade maior do que os não inoculados (Baysal, Soylu e Soylu, 2003).

Atividade de peroxidases nos tratamentos com a rizobactéria (L2-1) variou entre 101,083 a 255,687 mgP/min, sendo máxima aos 7 dias após os tratamentos, em plantas não inoculadas com Xam (Figura 8). Kilic-Ekici e Yuen (2004) verificaram aumento na atividade de peroxidases em *Festuca aurundinacea*, 2 dias após aplicação de rizobactéria. Chen *et al.* (2000), trabalhando com podridão de raízes de pepino causada por *Pythium aphanidermatum*, verificaram aumento na atividade de peroxidases à medida que a doença se desenvolvia, sendo o máximo de atividade observado 4-6 dias após a inoculação do patógeno. Utilizando do sistema de raízes bipartidas, os autores demonstraram a indução sistêmica de peroxidases pelos isolados 63-28 e 13 de *Pseudomonas* e por *P. aphanidermatum*. Silva *et al.* (2004) verificaram atividade extremamente alta de peroxidases em plantas de tomate infectadas e provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactéria, em relação aos outros tratamentos.

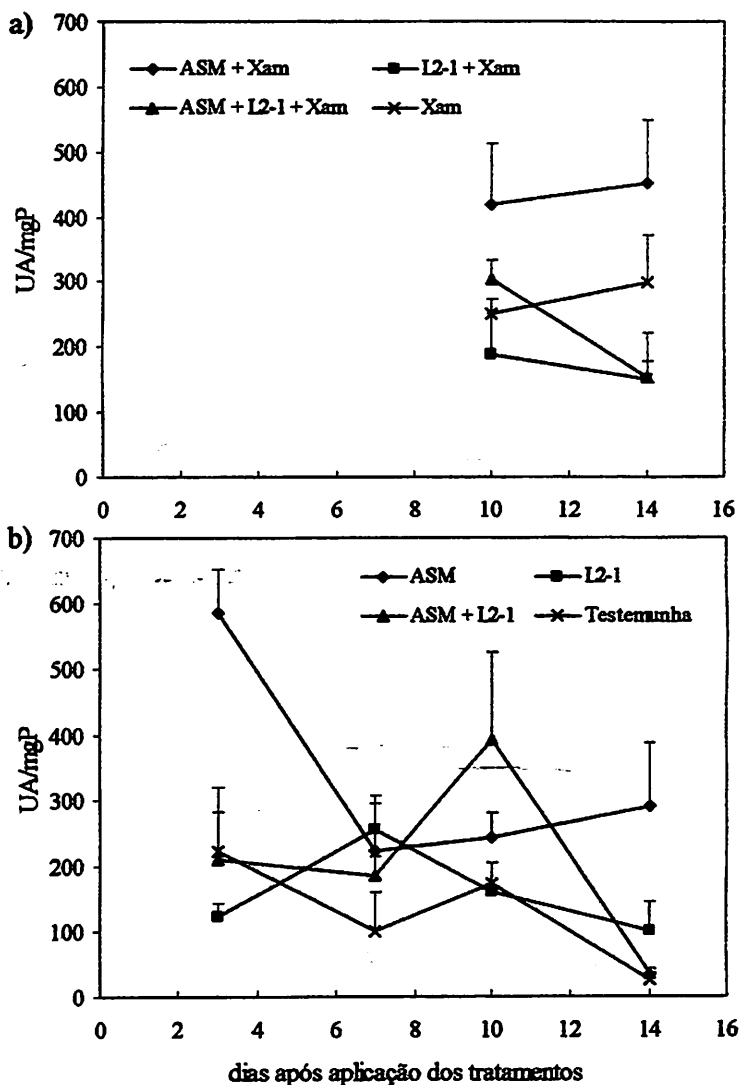
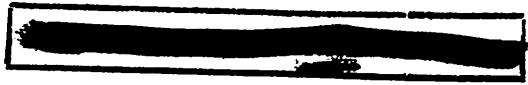


FIGURA 8 – Atividade de peroxidases determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha seguidos (a) ou não (b) da inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). As barras representam o desvio padrão.



Comparando a atividade enzimática com o conteúdo de proteínas solúveis totais, verificou-se que, assim como nas atividades da PAL e β -1,3-glucanases, nos tratamentos em que foram obtidas as maiores atividades enzimáticas (Figura 7) houve os menores valores de proteínas solúveis totais (Figura 2).

A análise das amostras por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida indicou a presença de peroxidase em todos os tratamentos, confirmando os resultados obtidos pela leitura da absorbância. Verificou-se que o acibenzolar-S-metil, a rizobactéria e *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ativaram apenas uma isoforma de peroxidase (Figura 9). Chen et al. (2000) verificaram que as isoformas de peroxidases nas raízes de pepino induzidas pelas rizobactérias foram diferentes daquelas presentes nas raízes infectadas por *P. aphanidermatum*, sugerindo que as enzimas de defesa da planta puderam ser estimuladas nas raízes de pepino colonizadas pelas rizobactérias não patogênicas ou numa interação compatível entre pepino e *P. aphanidermatum*. Os mecanismos de ativação das peroxidases pelas rizobactérias podem ser diferentes daqueles da infecção do patógeno.

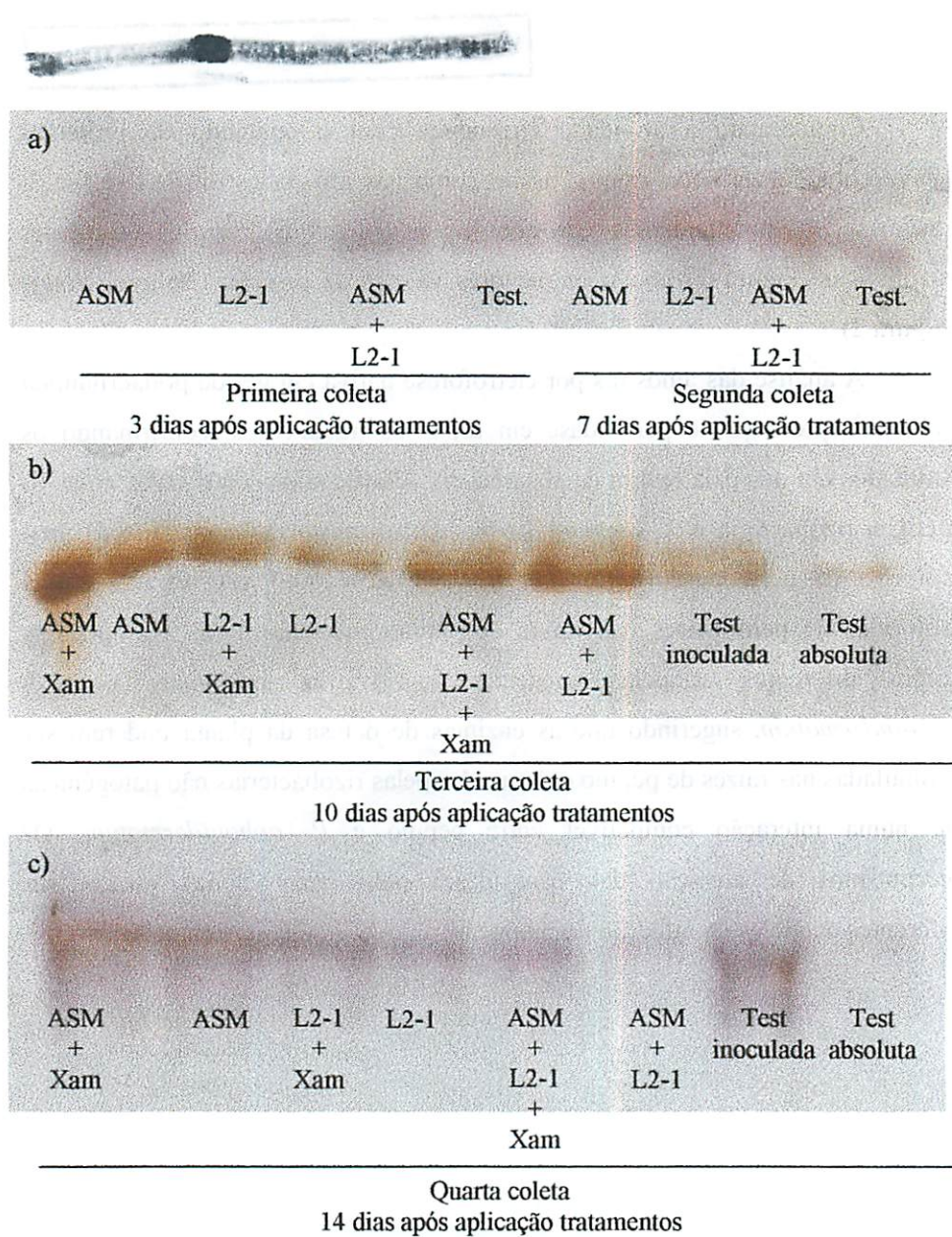


FIGURA 9 – Efeito de acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) sobre peroxidase em plantas de algodão aos 3 (a), 7 (a), 10 (b) e 14 (c) dias após a aplicação dos tratamentos.

5.4 Determinação de lignina

A deposição de lignina e polímeros fenólicos semelhantes à lignina em plantas de algodão foi determinada como derivados de TGA. Sete dias após a inoculação de Xam, a deposição de lignina foi maior nos tratamentos inoculados com o patógeno (ASM + Xam = 0,543; L2-1 + Xam = 0,525; ASM + L2-1 + Xam = 0,476 e Xam = 0,472 $\mu\text{g mg}^{-1}$) do que nos não inoculados (ASM = 0,517; L2-1 = 0,519; ASM + L2-1 = 0,458 e Testemunha absoluta = 0,398 $\mu\text{g mg}^{-1}$) (Figura 10). Além disso foi verificado que, em todos os tratamentos inoculados, o conteúdo de derivados de TGA foi maior do que na testemunha inoculada (Figura 10). Plantas inoculadas e tratadas com ASM apresentaram maior deposição de lignina em relação aos demais tratamentos. Quanto aos tratamentos não inoculados, verificou-se que as plantas tratadas com a rizobactéria (L2-1) apresentaram conteúdo de derivados de TGA maior do que os demais tratamentos não inoculados. A aplicação simultânea do ASM e da rizobactéria em plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno resultou nos menores teores de derivados de TGA. Como a deposição de lignina é acumulativa e sua determinação foi realizada apenas aos 7 dias após a inoculação de Xam, estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos na determinação das atividades das enzimas PAL e peroxidases, em que as maiores atividades ocorreram em plantas inoculadas tratadas com ASM, seguidas daquelas tratadas com a rizobactéria. A aplicação simultânea destes dois tratamentos resultou em menor atividade (Figuras 3 e 8). Peroxidases têm sido relacionadas numa variedade de processos de defesa de plantas, incluindo reação de hipersensibilidade, lignificação, “cross-linking” de fenólicos e glicoproteínas na parede, suberização e produção de fitoalexinas (Nicholson e Hammerschmidt, 1992). Assim, pode-se afirmar que a atividade da peroxidase determinada neste trabalho esteve relacionada à lignificação da parede celular como resposta de defesa da planta.

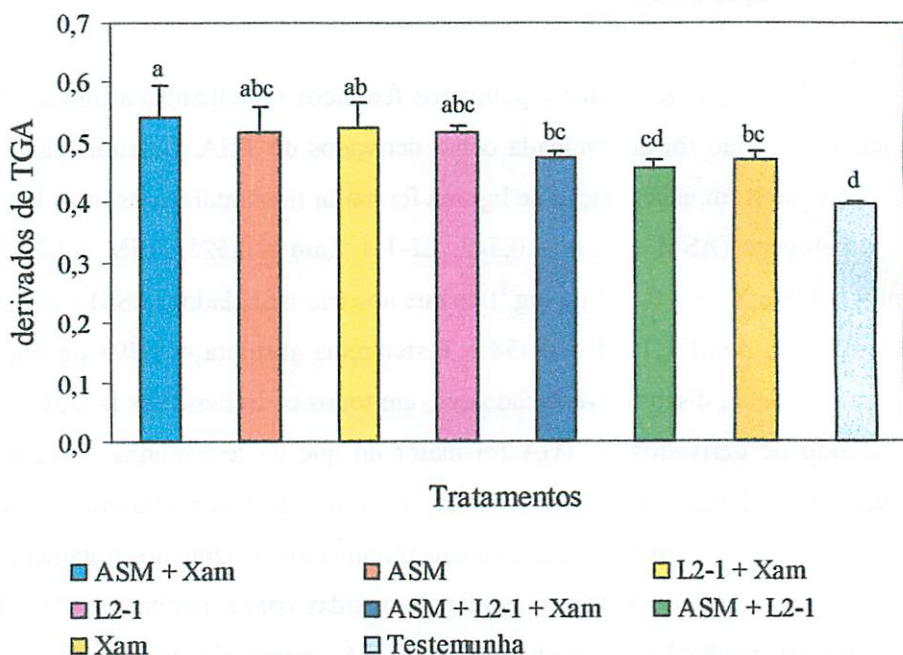


FIGURA 10 – Determinação de lignina em amostras de plantas de algodão, 14 dias após os tratamentos (7 dias após a inoculação de Xam): acibenzolar-S-metil (ASM), isolado de rizobactéria (L2-1), ASM + L2-1 e testemunha seguidos ou não da inoculação de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

A associação entre a resistência induzida por ASM e o aumento de deposição de lignina na parede celular e aumento da atividade das enzimas PAL e peroxidases POX foi aparente em outros patossistemas (Baysal, Soyly e Soyly, 2003; He, Hsiang e Wolyn, 2002). Em algodão, Smit e Dubery (1997)

verificaram que elicitores de *Verticillium dahliae* aumentaram a atividade de peroxidases, síntese e deposição de lignina e polímeros fenólicos semelhantes à lignina, resultando, assim, em resistência contra a murcha de *Verticillium*. Resultados semelhantes foram obtidos quando Dong *et al.* (2003) utilizaram extrato aquoso de micélio seco de *Penicillium chrysogenum* como indutor de resistência em hipocótilos de algodão contra a mesma doença.

No presente trabalho, verificou-se que a aplicação simultânea do ASM com a rizobactéria não aumentou a atividade das enzimas analisadas e deposição de lignina em relação à aplicação isolada do ASM. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em casa-de-vegetação (Tabela 2), em que plantas tratadas com ASM apresentaram maior redução da severidade da mancha angular, diferindo significativamente das plantas tratadas com a rizobactéria, sendo que o tratamento simultâneo do ASM e da rizobactéria proporcionou valores intermediários.

Estudos com resistência induzida têm demonstrado sua utilização como potente ferramenta no manejo de doenças causadas por bactérias. Em estudos sobre o efeito da indução de resistência contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, foi verificada redução de 68% do crescimento bacteriano nas plantas induzidas em relação à testemunha (Baysal, Soyly e Soyly, 2003). Isto sugere que inibidores de crescimento bacteriano são produzidos como resultado da indução de resistência ou que a planta responde rapidamente à inoculação pela produção de inibidores do crescimento bacteriano. As defesas induzidas podem impedir que as bactérias atinjam populações críticas necessárias para causar necrose ou podem, em algumas ocasiões, inibir a produção de fatores requeridos pela bactéria para iniciar a morte celular (Hammerschmidt, 1999).

6 CONCLUSÕES

- 1) O acibenzolar-S-metil e o isolado L2-1, utilizados isoladamente ou simultaneamente, reduziram significativamente a severidade da mancha angular do algodoeiro em relação à testemunha;
- 2) O melhor tratamento para o controle da mancha angular foi proporcionado pelo acibenzolar-S-metil, com 57,81% de controle em relação à testemunha;
- 3) Não houve efeito aditivo quando se utilizou o acibenzolar-S-metil simultaneamente com o isolado L2-1;
- 4) O acibenzolar-S-metil proporcionou os maiores aumentos nas atividades de PAL, peroxidases e β -1,3-glucanases e deposição de lignina;
- 5) As maiores atividades de PAL, peroxidases e β -1,3-glucanases ocorreram aos 14 dias após aplicação dos tratamentos com acibenzolar-S-metil e o isolado L2-1.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, Oxford, v.52, n.6, p.747-753, Dec., 2003.

BEAUDOIN-EAGAN, L.D.; THORPE, T.A. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, Rockville, v.78, n.3, p.438-441, 1985.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

CAVALCANTI, F.R. Atividade de enzimas antioxidativas e integridade de membranas em tecidos de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] submetidas ao estresse salino, Fortaleza: UFC, 2002, 100p. (Dissertação – Mestrado em Bioquímica).

CHEN, C.; BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v.56, n.1, p.13-23, Jan., 2000.

COLSON-HANKS, E.S.; DEVERALL, B.J. Effect of 2,6-dichloroisonicotinic acid, its formulation materials and benzothiazole on systemic resistance to alternaria leaf spot in cotton. *Plant Pathology*, Oxford, v.49, n.3, p.171-178, June, 2000.

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

DONG, H.; LI, W.; ZHANG, D.; TANG, W. Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against *Verticillium* wilt of cotton. *Crop Protection*, Oxford, v.22, n.1, p.129-134, Feb., 2002.

HALFELD-VIEIRA, B.A. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura, Viçosa: UFV, 2002, 98p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).

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

- HE, C.Y.; HSIANG, T.; WOLYN, D.J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, Oxford, v.51, n.2, p.225-230, Apr., 2002.
- HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; VAN PELT, J.A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, n.7, p.757-762, July, 1996.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, n.6, p.969-976, June, 1970.
- KILIC-EKICI, O.; YUEN, G.Y. Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. *Biological Control*, San Diego, v.x, p.xxx-xxx, 2004. (disponível em: www.sciencedirect.com)
- KNOESTER, M.; PIETERSE, C.M.; BOL, J.F.; VAN LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v.12, n.8, p.720-727, Aug., 1999.
- LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.3, p. 448-453, Mar., 1987.
- MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, London, v.82, n.5, p.535-540, Nov., 1998.
- MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. (eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. New York: Academic Press, 1989. p.113-158.
- NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.30, p.369-389, 1992.
- OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.107, n.1, p.19-28, Jan., 2001.
- ORNSTEIN, L. Disk eletrophoresis. I Background and theory, *Annual Review of the New York Academy of Science*, v.121, p.321, 1964.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol

- bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, Rockville, v.8, n.8, p.1225-1237, Aug., 1996.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOSTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Rockville, v.10, n.9, p.1571-1580, Sept., 1998.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Protection*, Oxford, v.20, n.1, p.1-11, Feb., 2001.
- RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acybenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology*, Oxford, v.51, n.5, p.621-628, Oct., 2002.
- RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, Rockville, v.8, n.10, p.1809-1819, Oct., 1996.
- SIDHU, G.S.; WEBSTER, J.M. The use of aminoacid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. *Physiological Plant Pathology*, London, v.11, n.2, p.117-127, 1977.
- SILVA, H.S.A.; DEUNER, C.C.; ROMEIRO, R.S.; CARRER FILHO, R.; BATISTA, U.G. Em suporte à estratégia de seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e para indução de resistência sistêmica e plantas com direcionamentos distintos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.304, ago., 2001a. (Suplemento).
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U.G.; CARRER FILHO, R. Biocontrole experimental da mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) - antagonismo microbiano ou indução de resistência sistêmica? *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.27, n.1, p.106, jan./mar., 2001b.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; DEUNER, C.C.; CARRER FILHO, R.; GARCIA, F.A.O. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p. 281, ago., 2001c. (Suplemento).
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic

resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, San Diego, v.29, n.2, p.288-295, Feb., 2004.

SILVA, L.H.C.P. Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro, Lavras: UFLA, 2002, 89p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

SMIT, F.; DUBERY, I.A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry*, St. Paul, v.44, n.5, p.811-815, May, 1997.

STADNIK, M.J. Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole-derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action. (Ph. D. Thesis) Univ. Hohenheim. Stuttgart. Germany. 1999.

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

TOWBIN, H. STAEHENLIN, T., GORDON, J. Eletrophorese transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: produces and some application. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologia Plantarum*, Warsaw, v.13, n.1, p.43-50, 1991.

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

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.

VAN WEES, A.C.M.; SWART, E.A.M.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Enhanced of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v.97, n.15, p.8711-8716, 2000.

VENÂNCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L.; PERES, N.A.R.P. Novos fungicidas. II - famoxadone e indutores de resistência. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.8, p.59-92, 2000.

XUE, L.; CHAREST, P.M.; JABAJI-HARE, S.H. Systemic induction of peroxidases, β -1,3-glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, St. Paul, v.88, n.4, p.359-365, Apr., 1998.

CAPÍTULO 5

**Efeito comparativo do acibenzolar-S-metil (ASM) com fungicidas e
antibiótico no controle da mancha angular do algodoeiro**

1 RESUMO

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Efeito comparativo do acibenzolar-S-metil (ASM) com fungicidas e antibiótico no controle da mancha angular do algodoeiro. In: Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro. Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Tese – Doutorado em Fitopatologia).

A eficiência do ASM foi comparada com os produtos kasugamicina, oxiclreto de cobre e cloreto de benzalcônio no controle da mancha angular do algodoeiro. O efeito *in vitro* dos produtos sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) foi avaliado nas concentrações de 0, 120, 240, 360 e 480 ppm. A avaliação foi realizada medindo-se o halo de inibição do crescimento bacteriano promovido pelos produtos. O efeito dos produtos no controle da mancha angular foi avaliado em casa-de-vegetação em dois ensaios: o primeiro para avaliar o tratamento preventivo e o segundo, o tratamento preventivo + curativo desta bacteriose. No tratamento preventivo, a aplicação dos tratamentos foi realizada 7 dias antes da inoculação de Xam e no tratamento preventivo + curativo, em 3 pulverizações, sendo a primeira 7 dias antes da inoculação e a segunda e terceira pulverizações, 7 e 21 dias depois da inoculação do patógeno. Em ambos ensaios, a dose utilizada para o ASM foi 10 g i.a./100L de água, enquanto os produtos foram utilizados em suas doses recomendadas. A severidade da mancha angular foi avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno. O ASM, kasugamicina e oxiclreto de cobre não inibiram o crescimento da bactéria *in vitro* até a concentração de 480 ppm, enquanto o cloreto de benzalcônio inibiu o crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas. No tratamento preventivo, ASM e cloreto de benzalcônio proporcionaram reduções significativas na severidade da doença em relação à testemunha, 83,14% e 41,25%, respectivamente. As plantas tratadas com oxiclreto de cobre e kasugamicina não diferiram significativamente da testemunha. No tratamento preventivo + curativo, apenas o ASM diferiu significativamente da testemunha. A severidade da mancha angular nas plantas tratadas com 3 aplicações do ASM foi reduzida, em média, 54,38% em relação às plantas da testemunha.

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

2 ABSTRACT —

ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone. Effect of acibenzolar-S-methyl (ASM), fungicides and antibiotic to control of cotton bacterial blight. In: Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria and acibenzolar-S-methyl (ASM) to control of cotton bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*). Lavras: UFLA, 2004. 130p. (Thesis - Doctorate in Phytopathology).*

The efficiency of ASM was compared with kasugamicina, copper oxychloride, benzalkonium chloride on control of cotton bacterial blight. The *in vitro* effect of them on *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) were evaluated in the following concentrations 0, 120, 240, 360 and 480 ppm. The inhibition halo of bacterial growth was assessed. The effect of the products on the control of bacterial blight was evaluated in greenhouse in two experiments. In the first was set up a preventive treatment and in the second, the preventive + curative treatment of the disease. In the preventive treatment, the application of treatments was accomplished 7 days before the inoculation of Xam and in the preventive + curative treatment, it was accomplished in 3 sprays, being the first, 7 days before the inoculation, and the second and the third sprays, 7 and 21 days after the inoculation of the pathogen. In both experiments, the dose used for ASM was 10 g a.i./100 L of water while the others products were used in their recommended doses. The severity of bacterial blight evaluated a 7, 14, 21 and 28 days after pathogen inoculation. ASM, kasugamicina and copper oxychloride did not inhibit bacteria growth *in vitro*, until 480 ppm, while the benzalkonium chloride inhibited it in all the tested concentrations. In the preventive treatment, ASM and benzalkonium chloride provided significant reductions on the severity of the disease in relation to the control, 83.14% and 41.25%, respectively. The treated plants with copper oxychloride and kasugamicina did not differ significantly from the control. In the preventive + curative treatment, ASM just differed significantly from the control. The severity of bacterial blight was reduced in the treated plants with 3 applications of ASM, on average, 54.38% in relation to the plants not treated.

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

3 INTRODUÇÃO

A mancha angular do algodoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings (1995) (Xam)) considerada de importância secundária nos últimos anos, tem preocupado seriamente agricultores, técnicos e pesquisadores pelo fato de serem freqüentes surtos mais severos da doença. A ocorrência desta bacteriose aumentou expressivamente na safra 2001/2002, nos estados do Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, especialmente com o uso de sementes infectadas, de variedades susceptíveis e do monocultivo (Cassetari Neto *et al.*, 2002).

O controle químico de doenças bacterianas é feito pelo uso de pulverizações com fungicidas à base de cobre e antibióticos. Os fungicidas à base de cobre encontram-se nas formulações comerciais sob quatro categorias: sulfatos básicos, oxicloretos, óxidos e hidróxidos. No Brasil, apenas o oxiclreto de cobre é recomendado para o controle da mancha angular do algodoeiro (Gimenes-Fernandes *et al.*, 1998). Os antibióticos disponíveis no mercado brasileiro são estreptomicina, tetraciclina e kasugamicina, isoladamente ou em misturas, mas nenhum deles é registrado para a cultura do algodão.

Nenhum trabalho científico foi conclusivo sobre o efeito curativo do cobre sobre esta bacteriose. O uso isolado de oxiclreto de cobre não tem controlado satisfatoriamente as doenças bacterianas (Araújo e Siqueri, 1999; Macagnan *et al.*, 1999; 2000; Mendonça *et al.*, 2002; Beriam, Malavolta Júnior e Costa, 1999; Malavolta Júnior, Almeida e Rodrigues Neto, 1999). No entanto, o uso de misturas entre fungicidas cúpricos e em combinação com antibióticos tem mostrado um bom controle (Scachetti *et al.*, 2002; Hussain e Tahir, 1993). Frenhani *et al.* (1969) verificaram que os tratamentos com fungicidas cúpricos (oxiclreto de cobre e óxido cuproso contendo cobre metálico) proporcionaram boa eficiência no controle da mancha angular.

O uso de oxitetraciclina + estreptomicina isoladamente ou em mistura com fungicidas cúpricos tem apresentado resultados promissores para o controle desta bacteriose. A multiplicação de Xam em meio nutriente ágar contendo oxitetraciclina + estreptomicina foi significativamente inibida nas concentrações de 5, 15, 30, 45 e 60 ppm, enquanto os sintomas da mancha angular foram significativamente menores em plantas tratadas com o antibiótico nas concentrações de 30, 45 e 60 ppm (Khan, 1995). Resultados semelhantes foram observados por Araújo e Siqueri (1999) ao compararem a eficácia de oxitetraciclina + sulfato de estreptomicina e oxiclreto de cobre na cultivar CNPA Ita 90, em que o tratamento com os antibióticos proporcionou um bom controle desta bacteriose. Hussain e Tahir (1993) verificaram que plantas tratadas com oxitetraciclina + estreptomicina em combinação com oxiclreto de cobre apresentaram menor índice de doença e maior produção de sementes quando comparadas à testemunha, enquanto Scachetti *et al.* (2002) verificaram que a mistura de oxitetraciclina + sulfato de cobre tribásico + estreptomicina + oxitetraciclina proporcionou as menores notas de incidência, severidade e maior número de capulhos.

Além dos fungicidas cúpricos e antibióticos, novas moléculas vêm sendo estudadas no controle de doenças bacterianas, com resultados promissores, como é o caso do acibenzolar-S-metil (ASM), o ativador de resistência melhor estudado e o primeiro produto comercial sob os nomes de BION®, ACTIGARD™ e BOOST® (Venâncio *et al.*, 2000). O ASM tem mostrado eficiência no controle de *Ralstonia solanacearum* (Silva *et al.*, 2001a; Castro *et al.*, 2000; 2001), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Bausal, Soyly e Soyly, 2003) e *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro (Silva *et al.*, 2001a; 2001b; 2003a; 2003b; Maia, Romeiro e Lustosa, 2000) e *X. campestris* pv. *phaseoli* (Romeiro *et al.*, 1999; Jesus Júnior *et al.*, 1999) em feijão. O Fegatex® é um fungicida elaborado à base de cloretos de benzalcônio

(N-Cloreto Alquil Dimetil Benzil Amônio e N-Cloreto Alquil Dimetil Etil Benzil Amônio), do grupo químico quaternários de amônio, que age por contato. Este produto tem sido estudado no controle das doenças fúngicas do cafeeiro (Guzzo *et al.*, 1999; Chalfoun *et al.*, 1998) e tomateiro, para o qual se tem observado também o controle de doenças bacterianas no campo (dados não publicados).

O presente trabalho teve como objetivos comparar a eficiência do acibenzolar-S-metil com os produtos kasugamicina, oxiclureto de cobre e clureto de benzalcônio sobre o crescimento *in vitro* de Xam e no controle preventivo da mancha angular do algodoeiro; bem como a eficiência de três aplicações destes produtos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem, isolamento e preservação do patógeno

O isolado foi obtido de folhas de algodoeiro apresentando lesões típicas de mancha angular, provenientes da região algodoeira do estado de Mato Grosso. Folhas com lesões típicas de mancha angular foram herborizadas no local de coleta. Posteriormente, procedeu-se o isolamento utilizando-se o meio 523 (Kado e Heskett, 1970) pelo método de estrias paralelas e posterior incubação por 48 h a 28 °C. Em seguida, o material foi repicado para tubos de ensaio contendo meio 523 inclinado. A patogenicidade do isolado foi constatada por inoculação, pulverizando-se a face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10⁹ UFC/mL. As plântulas inoculadas foram mantidas por 24 h antes e depois da inoculação em câmara úmida, sendo em seguida levadas para casa-de-vegetação. Após o aparecimento dos sintomas, o patógeno foi reisolado das lesões pelo método anteriormente citado. A preservação do isolado durante o decorrer do experimento foi em peptona glicerol a -80 °C (Lazo e Gabriel, 1987) e em folhas herborizadas.

4.2 Efeito *in vitro* de produtos químicos sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

O efeito de acibenzolar-S-metil (ASM), oxicloreto de cobre, kasugamicina e cloreto de benzalcônio sobre Xam foi avaliado *in vitro*. Foram utilizadas as seguintes concentrações dos produtos: 0, 120, 240, 360 e 480 ppm. Os produtos foram adicionados em discos de papel de filtro esterilizados com 5,5 mm de diâmetro. Em cada placa de Petri contendo meio 523, foram adicionados 5 mL de meio 523 semi-sólido fundente, contendo 100 µL da

suspensão bacteriana e, posteriormente, 2 discos equidistantes com os produtos a serem testados, na mesma concentração (Mariano *et al.*, 2000). As placas foram incubadas por 48h a 28 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado no esquema fatorial 4 x 5 (4 produtos x 5 concentrações), totalizando 20 tratamentos, com 4 repetições. A avaliação foi realizada medindo-se o halo de inibição do crescimento bacteriano promovido pelos produtos.

4.3 Efeito de diferentes produtos químicos no controle da mancha angular do algodoeiro

Sementes de algodão da cultivar CNPA Ita 90 foram semeadas em vasos (1,5 kg) contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1) esterilizada com brometo de metila. Os produtos testados com suas respectivas dosagens estão listados na Tabela 1. A aplicação dos tratamentos foi feita 7 dias antes da inoculação de Xam, realizada 36 dias após o plantio, pela pulverização da face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL. As plantas inoculadas foram mantidas por 24 h antes e depois da inoculação em câmara úmida, sendo em seguida levadas para casa-de-vegetação.

TABELA 1- Descrição dos produtos testados no controle da mancha angular do algodoeiro.

Produto	Marca Comercial	Dose utilizada
Kasumgamicina	Hokko Kasumin	500 mL /100L de água
Oxicloreto de Cobre	Cobox	250 g /100L de água
Cloreto de benzalcônio	Fegatex	300 mL /100L de água
Acibenzolar-S-metil	Bion	10 g/100L de água

O delineamento experimental foi blocos casualizados, com 5 tratamentos e 4 repetições (6 plantas/repetição). As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno, quando foi avaliada a severidade da mancha angular. Para todos os ensaios foi utilizada uma adaptação da escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977), a qual é baseada em um critério de notas que variam de 0 a 4, conforme a severidade da doença (Tabela 2).

TABELA 2 – Escala de avaliação de Sidhu e Webster (1977) adaptada para severidade da mancha angular do algodoeiro.

Nota	Severidade
0	0% de folha lesionada
1	de 1 a 25% de folha lesionada
2	de 26 a 50% de folha lesionada
3	de 51 a 75% de folha lesionada
4	acima de 76% de folha lesionada

4.4 Efeito de diferentes produtos químicos no controle da mancha angular do algodoeiro em 3 aplicações

Foi avaliado o efeito de diferentes produtos, em três aplicações, no controle da mancha angular do algodoeiro. Sementes de algodão da cultivar CNPA Ita 90 foram semeadas em vasos (1,5 kg) contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1) esterilizada com brometo de metila. Os produtos testados, com suas respectivas dosagens, estão listados na Tabela 1. A aplicação dos

tratamentos foi realizada em 3 pulverizações, sendo a primeira 7 dias antes da inoculação e a segunda e terceira pulverizações, 7 e 21 dias depois da inoculação de Xam. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 5 tratamentos (4 produtos, 1 testemunha) e 4 repetições (6 plantas/repetição). A avaliação foi realizada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno, quando foi avaliada a severidade da mancha angular através da escala de Sidhu e Webster (1977) adaptada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito *in vitro* de produtos químicos sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

O cloreto de benzalcônio inibiu a bactéria em todas as concentrações testadas, comprovando seu efeito bactericida, porém o maior efeito foi observado nas dosagens superiores a 240 ppm (Tabela 3). Entretanto não houve efeito inibitório no crescimento bacteriano pelo ASM, oxiclreto de cobre e kasugamicina, mesmo nas maiores concentrações testadas (Tabela 3). O efeito fungicida deste produto tem sido demonstrado sobre os principais fungos causadores de doença em cafeeiro (Guzzo *et al.*, 1999; Chalfoun *et al.*, 1998).

TABELA 3 – Efeito de produtos químicos sobre o crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *malvacearum*.

Produtos	Concentrações (ppm)				
	0	120	240	360	480
Acibenzolar-S-metil	-	-	-	-	-
Oxiclreto de Cobre	-	-	-	-	-
Kasugamicina	-	-	-	-	-
Cloreto de benzalcônio	0 b	0,84 b ¹	0,96 a	1,05 a	1,08 a
CV (%)	6,68				

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O ASM como um indutor de resistência não teve efeito direto sobre o patógeno, como foi observado no Capítulo 3. Resultados semelhantes foram obtidos com as bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, em que o ASM não teve efeito direto *in vitro* mesmo nas maiores concentrações (Silva, 2002; Kobayashi *et al.*, 2001). Em testes *in vitro*, o oxiclureto de cobre também não inibiu os isolados de *X. campestris* pv. *passiflorae* (Beriam, Malavolta Júnior e Costa, 1999) e de *X. campestris* pv. *viticola* em concentrações até 100 ppm (Malavolta Júnior, Almeida e Rodrigues Neto, 1999). Entretanto, Peixoto *et al.* (1996) verificaram que o oxiclureto de cobre, em alta concentração (10.000 ppm) ou em mistura com Kasugamicina (4.000 ppm + 5.000 ppm), inibiu os isolados de *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. campestris* pv. *melonis*.

5.2 Efeito de diferentes produtos químicos no controle da mancha angular do algodoeiro

Todos os produtos reduziram a severidade da mancha angular quando comparados à testemunha (Tabela 4). No entanto, apenas o ASM e o cloreto de benzalcônio diferiram significativamente da testemunha, proporcionando reduções significativas na severidade da doença. A severidade da mancha angular em plantas tratadas com ASM foi reduzida, em média, 83,14% em relação às plantas da testemunha, enquanto, em plantas tratadas com cloreto de benzalcônio, a redução foi de 41,25%. Silva *et al.* (2003a) verificaram que em plantas tratadas com ASM, a severidade da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas vesicatoria*) foi reduzida em média 70%. No entanto, Soares e Maringoni (2002) verificaram que o ASM não apresentou eficácia na indução de resistência à murcha-de-*Curtobacterium*. O cloreto de benzalcônio foi eficiente no controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) (Guzzo *et al.*, 1999),

mas não no controle da mancha aureolada (*P. syringae* pv. *garcae*) (Jesus Júnior *et al.*, 2002).

TABELA 4 – Efeito comparativo entre ASM, oxiclreto de cobre, kasugamicina e cloreto de benzalcônio sobre a severidade (AACPD) mancha angular do algodoeiro.

Tratamentos	AACPD	Porcentagem de controle em relação à testemunha
Acibenzolar-S-metil	10,46 c ¹	83,14
Cloreto de benzalcônio	36,45 b	41,25
Oxicloreto de Cobre	42,55 ab	31,42
Kasugamicina	54,74 ab	11,77
Testemunha	62,04 a	-
CV (%)	26,27	

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

As plantas tratadas com oxiclreto de cobre e kasugamicina não diferiram significativamente da testemunha, apesar de reduzirem a severidade, em média, 31,42% e 11,77%, respectivamente. O oxiclreto de cobre, quando aplicado isoladamente, não tem proporcionado controle satisfatório de algumas doenças bacterianas, tais como mancha angular do algodoeiro (Araújo e Siqueri, 1999), mancha bacteriana do pimentão (Macagnan *et al.*, 1999; 2000) e mancha bacteriana pequena do tomateiro (Mendonça *et al.*, 2002), no entanto tem sido eficiente para o controle da mancha aureolada do cafeeiro (Jesus Júnior, 2002; Gregorine, Goes e Reis, 2000).

A kasugamicina foi eficiente no controle da mancha angular do morango (*X. campestris* pv. *fragariae*) (Paradela *et al.*, 2001) e da bacteriose do pepino (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) (Igarashi *et al.*, 1999).

5.3 Efeito de 3 aplicações dos produtos testados no controle da mancha angular do algodoeiro

Observou-se que apesar de todos os tratamentos reduzirem a severidade da mancha angular quando comparados à testemunha, apenas o ASM diferiu significativamente (Tabela 5). A severidade da mancha angular nas plantas tratadas com 3 aplicações do ASM foi reduzida, em média, 54,38% em relação às plantas da testemunha. No entanto, verificou-se que, quando o ASM foi aplicado uma única vez, aos 7 dias antes da inoculação, houve redução de 83,14% em relação à testemunha (Tabela 4). Resultados semelhantes podem ser observados no Capítulo 3 (Tabela 3), cujo melhor tratamento no controle da mancha angular foi aquele em que o ASM foi aplicado uma única vez aos 7 dias antes da inoculação do patógeno. Enquanto a eficiência da kasugamicina aumentou (27,34%), a eficiência do oxicleto de cobre e do cloreto de benzalcônio diminuiu (11,23% e 10,15%, respectivamente).

TABELA 5 – Efeito comparativo de 3 aplicações de ASM, oxiclreto de cobre, kasugamicina e cloreto de benzalcônio sobre a severidade (AACPD) da mancha angular do algodoeiro.

Tratamentos	AACPD	Porcentagem de controle em relação à testemunha
Acibenzolar-S-metil	39,31 b ¹	54,38
Kasugamicina	62,61 ab	27,34
Oxiclreto de Cobre	76,49 a	11,23
Cloreto de benzalcônio	77,42 a	10,15
Testemunha	86,17 a	-
CV (%)	23,14	

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

- 1) ASM, oxiclreto de cobre e kasugamicina não inibiram o crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* até a concentração de 480 ppm;
- 2) Cloreto de benzalcônio inibiu o crescimento da bactéria a partir de 120 ppm;
- 3) ASM e cloreto de benzalcônio, quando aplicados preventivamente foram eficientes no controle de *X. axonopodis* pv. *malvacearum*;
- 4) ASM aplicado uma única vez, 7 dias antes da inoculação, foi mais eficiente no controle da mancha angular do algodoeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.E.; SIQUERI, F.V. Avaliação da eficiência do uso de oxiclreto de cobre e da mistura oxitetraciclina + sulfato de estreptomina no controle da mancha angular do algodoeiro. **Comunicação Técnica Embrapa Algodão**, n.105, 1999. 3p.

BAUSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, n.6, p.747-753, Dec., 2003.

BERIAM, L.O.S.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; COSTA, F. Controle químico *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.25, n.1, p.26, jan./mar., 1999.

CASSETARI NETO, D.; PRADE, A.G.; FORNAROLLI, D.A.; MACHADO, A.Q.; ANDRADE, J.R.; ÁVILA, W.P.; CAYE, S.; ARNHOLD, D. Efeito da guazatina no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.57, ago., 2002. (Suplemento).

CASTRO R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; AZEVEDO, L.A.S. Efeito do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl na proteção contra doenças, incremento de produção e qualidade de frutos em tomate estaqueado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.492, ago., 2001. (Suplemento).

CASTRO, R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; GUICHERIT, E. Redução na severidade de doenças e incremento da produção e qualidade dos frutos de tomate estaqueado em áreas comerciais através da aplicação do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.324, ago., 2000. (Suplemento).

CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.L.; CHAGAS, S.J.R.; COSTA, L. Efeito da redução de microrganismos através do tratamento químico pré-colheita sobre a qualidade do café. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**. Poços de Caldas, p.185-187, 1998.

FRENHANI, A.A.; SILVEIRA, A.P.; ABRAÃO, J.; BASTOS CRUZ, B.P.; SILVEIRA, S.G.P. Controle químico da mancha angular (*Xanthomonas malvacearum* (E.F. Sm) Dows.) do algodoeiro (*Gossypium* spp.) no Estado de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo, v.35, p.219-222, 1969.

GIMENES-FERNANDES, N.; KIMATI, H.; KUROSAWA, C.; SOAVE, J.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL (eds.). **Guia de fungicidas agrícolas**:

recomendações por produtos. 2.ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologista, v.2, 1998. 220p.

GREGORINE, G.F.; GOES, A.; REIS, R.F. Efeito de oxiclóreto de cobre; isoladamente ou combinado com mancozeb e antibióticos, no controle de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em cafeeiros cv. Mundo Novo. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.26, n.1, p.125, jan./mar., 2000.

GUZZO, S.D.; HAKAKAVA, R.; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F.; ROVERATTI, D.S. Proteção de cafeeiros contra *Hemileia vastatrix* por cloreto de benzalcônio (composto de amônio quaternário). *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.25, n.4, p.339-345, out./dez., 1999.

HUSSAIN, T.; TAHIR, M. Chemical control of bacterial blight of cotton. *Pakistan Journal of Phytopathology*, Karachi, v.5, n.1-2, p.119-121, 1993.

IGARASHI, S.; OLIVEIRA, M.A.C.; HAMA, S.; KAJIHARA, L. Avaliação do bactericida kasugamycin no controle de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* na cultura do pepino. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.249, ago., 1999. (Suplemento).

JESUS JUNIOR, W.C.; ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; PEREIRA, J.L.A. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.293, ago., 1999. (Suplemento).

JESUS JÚNIOR, W.C.; ZAMBOLIM, L.; SILVA, H.S.; VALE, F.X.R.; SILVA, C.L. Controle químico da mancha aureolada do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, p.61, ago., 2002. (Suplemento)

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, n.6, p.969-976, June, 1970.

KHAN, M.A. In vitro sensitivity of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* to agrimycin-100 and its effect on cotton plant in relation to symptom expression. *Pakistan Journal of Phytopathology*, Karachi, v.7, n.2, p.199-201, 1995.

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

- LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.3, p. 448-453, Mar., 1987.
- MACAGNAN, D.; CARMO, M.G.F.; CARVALHO, A.O.; CARVALHO, E.S.; GUEDES, J.N. Controle da mancha bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas vesicatoria*, no estado do Rio de Janeiro. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.26, n.1, p.127, jan./mar., 2000.
- MACAGNAN, D.; CARMO, M.G.F.; CARVALHO, A.O.; RUBIO, E.; SANTOS, R.P. Efeitos do inoculo inicial e de aplicações de fungicida cúprico no progresso da mancha bacteriana do pimentão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p.251, ago., 1999. (Suplemento).
- MAIA, C.B.; ROMEIRO, R.S.; LUSTOSA, DC. Avaliação de fitotoxidez e efetividade de cibenzolar-s. methyl como indutor de resistência em tomateiro a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, p.324, ago., 2000. (Suplemento).
- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J. Ação *in vitro* de alguns bactericidas sobre *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.25, n.1, p.26, jan./mar., 1999.
- MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A. Isolamento de bactérias-para testes de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). *Manual de práticas em Fitobacteriologia*. Recife: O autor 2000. p.115-119.
- MENDONÇA, H.L.; ROMEIRO, R.S.; MESSAGE, D.; MACAGNAN, D.; SILVA, H.S.A.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA JÚNIOR, J.R.; GARCIA, F.A.O. Estudo comparativo entre diferentes tratamentos químicos e biológicos no controle da mancha pequena do tomateiro em condições de casa-de-vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, p.65, ago., 2002. (Suplemento)
- PARADELA, A.L.; PARADELA FILHO, O.; SILVA, C.L.; BUSCARATO, E.; ALVAREZ JÚNIOR, J.A.A. Eficiência de alguns bactericidas no controle da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) na cultura do morango (*Fragaria vesca*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.272, ago., 2001. (Suplemento)
- PEIXOTO, A.R.; KARASAWA, M.; TAVARES, S.C.C.; SILVA, W.A. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pseudomonas solanacearum* e *Xanthomonas campestris* a alguns fungicidas e bactericidas comerciais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, p.345, ago., 1996. (Suplemento)

ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; JESUS JÚNIOR, W.C.; PEREIRA, J.L.A. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. campestris* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.255, ago., 1999. (Suplemento).

SCACHETTI, A.P.; PARADELA, A.; OLIVEIRA, J.R.S.; MUNHOZ, R.A. Eficiência de alguns fungicidas-bactericidas no controle da mancha angular (*Xanthomonas malvacearum*) na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.28, n.1, p.114, jan./mar., 2002.

SIDHU, G.S.; WEBSTER, J.M. The use of aminoacid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v.11, n.2, p.117-127, 1977.

SILVA, L. H. C. P. Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças no tomateiro. Lavras: UFLA, 2002, 89p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R.; CASTRO, A.M.S. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.29, n.2, p.177-181, abr./jun., 2003a.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R. Avaliação comparativa do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* no tomateiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.29, n.3, p.244-248, jul./set., 2003b.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.294, ago, 2001a. (Suplemento).

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

SOARES, R.M., MARINGONI, A.C. Efeito de acibenzolar-s-methyl sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.28, n.1, p.41-45, 2002.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal Systematic Bacteriology, Washington, v.45, n.3, p.472-489, July, 1995.

VENÂNCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L.; PERES, N.A.R.P. Novos fungicidas. II - famoxadone e indutores de resistência. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.8, p.59-92, 2000.