

## **Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro**

*Effect of chemicals on the bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) and the activation of pathogenesis-related proteins in tomato*

Adriana Terumi Itako<sup>1</sup>, João Batista Tolentino Júnior<sup>2</sup>, Tadeu A. Fernandes da Silva Júnior<sup>1</sup>, José Marcelo Soman<sup>1</sup>, Antonio Carlos Maringoni<sup>1</sup>

### **RESUMO**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação de fungicidas e antibiótico no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) em tomate e na ativação de proteínas relacionada à patogênese. Para avaliação da severidade da doença foi utilizada o híbrido de tomate "AP529". Os tratamentos consistiram da pulverização com acibenzolar-S-metil, fluazinam, piraclostrobina, piraclostrobina + methiran, oxicleto de cobre, oxicleto de cobre + mancozeb e oxitetraciclina, além de uma testemunha inoculada e uma testemunha não inoculada. Após três dias do tratamento, as plantas foram inoculadas com a bactéria *X. perforans* ( $10^6$  UFC/mL). Discos foliares foram coletadas para avaliação das enzimas peroxidase, polifenoloxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase, fenilalanina amônia liase e protease. Com os dados da severidade foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Todos os tratamentos apresentaram redução da AACPD em relação à testemunha inoculada. Os fungicidas acibenzolar-S-metil, piraclostrobina e piraclostrobina + methiran tiveram resultados mais satisfatórios na redução da severidade da mancha bacteriana em tomateiro. Os produtos à base de piraclostrobina juntamente com acibenzolar-S-metil induziram as atividades enzimáticas de peroxidase, polifenoloxidase e  $\beta$ -1,3 glucanase, evidenciando que estes produtos podem estar relacionados à indução de resistência à mancha bactéria em plantas de tomateiro.

**Palavras-chave:** indução de resistência, peroxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase, acibenzolar-S-metil e piraclostrobina.

### **ABSTRACT**

*The present study aims to evaluate the effect of fungicides and antibiotics to control bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) in tomato, and the activation of pathogenesis-related proteins. Hybrid tomato AP 529 was used to assess the severity of disease. The treatments consisted of spraying with acibenzolar-S-methyl, fluazinam, pyraclostrobin, pyraclostrobin + methiran, copper oxychloride, copper oxychloride and mancozeb + oxytetracycline, and inoculated and non-inoculated controls. After three days of treatment, all plants were inoculated with *X. perforans* ( $10^6$  CFU / mL). Leaf discs were collected for assessment of peroxidase, polyphenol oxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase, phenylalanine ammonia lyase and protease. The area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated with the data of severity. All treatments had reduced AUDPC compared to the inoculated control. Fungicides acibenzolar-S-methyl, pyraclostrobin, and pyraclostrobin + methiran had more satisfactory results in reducing the severity of bacterial spot on tomato. The products based on pyraclostrobin together with acibenzolar-S-methyl induced enzymatic activities of peroxidase, polyphenoloxidase and  $\beta$ -1,3 glucanase, indicating that these products may be related to the induction of resistance to bacterial spot on tomato plants.*

**Key words:** inducing resistance, peroxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase, acibenzolar-S-methyl and pyraclostrobin.

<sup>1</sup> Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônomicas/UNESP, Caixa Postal 237, CEP 18.603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Biossistemas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Esalq/USP, Av Pádua Dias, 11, CEP 13.418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Autor para correspondência: Adriana Terumi Itako

E-mail: atitako@yahoo.com.br

## Introdução

A cultura do tomateiro é a segunda hortaliça de importância econômica no mundo, superada apenas pela cultura da batata. (Camargo Filho e Mazzei, 1996; Silva e Giordano, 2000; Filgueira, 2008). Entretanto, várias doenças têm prejudicado a produção dessa cultura, entre elas, a mancha bacteriana do tomateiro, causada por espécies de *Xanthomonas*. A mancha-bacteriana é uma doença de difícil controle, tanto para o tomateiro estaqueado quanto para o tomateiro industrial, principalmente em condições de umidade e temperatura elevadas (Lopes e Quezado-Duval, 2005).

Várias estratégias preventivas de controle dessa doença são utilizadas, como uso de sementes e mudas saudáveis, rotação de culturas, entre outras (Lopes e Quezado-Duval, 2005; Silva-Lobo *et al.*, 2005; Kurozawa e Pavan, 2005). A utilização de produtos químicos à base de cobre, misturas cuprocarbamatos e antibiótico também são utilizados, porém uma vez estabelecida a doença em campo essas estratégias nem sempre são eficazes, além de causar problemas de seleção de estirpes bacterianas resistentes.

Alguns fungicidas registrados para a cultura do tomateiro, neste caso o grupo das estrobirulinas (Köehle *et al.*, 2002) além das vantagens obtidas pela ação de efeitos fisiológicos positivos deste sobre as plantas, há evidências que são capazes ativar mecanismos bioquímicos da planta que incrementam a resistência aos patógenos (Venancio *et al.*, 2003) podendo ser uma possibilidade de uso no controle da mancha bacteriana.

A indução de resistência em plantas pode ser definida como uma resistência dinâmica baseada na produção de barreiras físicas e/ou bioquímicas estimuladas pela aplicação de uma substância indutora. É um fenômeno sistêmico ou local, efetivo contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos ou vírus (Romeiro, 2008).

A resistência induzida de plantas a patógenos pode e têm sido conseguida pela aplicação de produtos químicos sintéticos em plantas. Após o desenvolvimento do acibenzolar-S-metil, observou-se um considerável avanço na indução de resistência (Sobrinho *et al.*, 2005). Para a mancha bacteriana é conhecida a eficácia desse produto no controle da doença em alguns trabalhos desenvolvidos no Brasil e no exterior (Louws *et al.*, 2001; Cavalcanti *et al.*, 2006), porém há relatos na literatura evidenciando a redução na produção (Lewis *et al.* 2005; Louws

*et al.* 2001; Quezado-Duval *et al.*, 2005), devido ao gasto energético (Kunh e Pascholati, 2010).

A utilização de produtos que induzem mecanismos de resistência nas plantas constitui como uma alternativa para o manejo integrado dessa doença. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar sob condições de casa-de-vegetação a ação de produtos químicos no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) do tomateiro e na ativação de proteínas relacionada à patogênese.

## Material e Métodos

### Avaliação dos produtos químicos sobre a mancha bacteriana, em condições de casa-de-vegetação

Para avaliar a severidade da mancha bacteriana no tomateiro, sementes do híbrido AP529 foram semeadas em bandeja de poliestireno contendo substrato. Aos 25 dias após a germinação, duas plantas foram transplantadas para vaso de 3 L de capacidade. Após 15 dias do transplantio, as plantas de tomate foram pulverizadas com os produtos: acibenzolar-S-metil (2,5 g i. a./100 L), fluazinam (25 g i. a./100 L), piraclostrobina (8 g i. a./100 L), piraclostrobina + methiran (20 g + 220 g i. a./100L), oxicleto de cobre (150 g i. a./100 L), oxicleto de cobre + mancozeb (88 g + 60 g i. a./100 L) e oxitetraciclina (40 g i. a./100 L), além de uma testemunha inoculada e uma testemunha não inoculada. Três dias após a pulverização, as plantas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana de *X. perforans* ( $10^6$  UFC/mL).

A severidade da doença foi avaliada pela escala diagramática da área foliar lesionada, conforme Mello *et al.* (1997). As avaliações foram realizadas aos 8, 11, 14, 17 e 20 dias após a inoculação (DAI). Com os valores de severidade obtidos, foi determinada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme Campbell e Madden (1990).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 9 tratamentos (7 produtos químicos, testemunha inoculada (TI) e testemunha sem inoculação (TSI)) e 7 repetições, sendo cada parcela constituída por um vaso, contendo 2 plantas cada. Os valores da AACPD foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### **Determinações enzimáticas em plantas de tomateiro pulverizadas com produtos químicos e inoculadas com *X. perforans***

Para realizar a coleta de amostras foliares para a determinação das atividades enzimáticas, plantas de tomateiro do híbrido AP529 foram plantadas, tratadas e inoculadas conforme descrição no item anterior. Amostras de folhas foram coletadas 1 dia antes e dia após a pulverização com fungicidas e antibiótico e 1, 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 9 tratamentos (7 produtos químicos, testemunha sem inoculação (TSI) e testemunha inoculada (TI) e 5 repetições.

### **Determinações enzimáticas em plantas de tomateiro pulverizadas com produtos químicos sem inoculação bacteriana**

Para avaliar o efeito dos produtos químicos sem a presença da bactéria, foi instalado um ensaio com os mesmos procedimentos anteriores, porém sem a inoculação com *X. perforans*. Os tratamentos foram: acibenzolar-S-metil (ASM – 2,5 g i. a./100 L), fluazinam (FL – 25 g i. a./100 L), piraclostrobina (P – 8 g i. a./100 L), piraclostrobina + methiran (P + M – 20 g + 220 g i. a./100 L) e oxicloreto de cobre (OC – 150 g i. a./100 L).

As coletas dos discos foliares seguiram os mesmos padrões descritos anteriormente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos (5 produtos químicos e testemunha sem pulverização (TSP)) e 5 repetições.

### **Determinações das atividades enzimáticas**

As amostras das folhas coletadas foram homogeneizadas mecanicamente com nitrogênio líquido em 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), com auxílio de almofariz. O homogenato foi centrifugado a 20.000 g durante 25 min a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi considerado como extrato enzimático e armazenado a –20 °C para posterior quantificação das enzimas. Foram determinadas as atividades das enzimas peroxidase, polifenoloxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase, fenilalanina amônia – liase e protease.

A atividade da enzima peroxidase foi determinada a 30°C pelo método direto espectrofotométrico,

pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Lusso e Pascholati, 1999). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica e os resultados foram expressos em  $\Delta_{\text{abs}} 470 \text{ nm min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

A atividade de polifenoloxidase foi obtida pelo método de Duangmal e Apentem (1999). A reação foi realizada misturando-se 900  $\mu\text{L}$  do substrato e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0). As leituras foram realizadas de forma direta por um período de 3 min. Os resultados foram expressos em  $\Delta_{\text{abs}} 420 \text{ nm min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

A enzima  $\beta$ -1,3 glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada de laminarina, por meio do uso da hidrazida do ácido  $\beta$ -hidroxibenzoico (PAHBAH) (Lever, 1972). A mistura da reação foi incubada a 37 °C por 1 h, contendo 150  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 150  $\mu\text{L}$  de laminarina (2,0 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) (Abeles e Foence, 1970). Após esse período, foi acrescentado 1,5 mL de solução de PAHBAH (0,5 g dissolvido em 20 mL de HCL 0,5 M, acrescido de 80 mL de NaOH 0,5 M), e em seguida essa mistura foi aquecida a 100 °C, por 10 min. Após o resfriamento até a temperatura de 25 °C, as amostras tiveram suas absorvâncias determinadas a 410 nm, contra o tampão de extração.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (Umesha, 2006). A absorvância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (esse controle correspondia a uma mistura 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico e 900  $\mu\text{L}$  de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). As leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão para o ácido trans-cinâmico e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido trans-cinâmico  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da protease foi obtida de acordo com a metodologia utilizada por Fialho (2004), para tanto, 0,5 g de caseína foi dissolvida em 40 mL de água destilada e deixada sob agitação durante 20 min. Em seguida foi adicionado 1 mL de NaOH 1 M e 2,5 mL de Tris 1 M. Após um período de agitação, com a caseína completamente dissolvida, o pH foi ajustado para 7,8 com ácido fosfórico 85%. Para a reação, 500  $\mu\text{L}$  do substrato foi incubado

com 200 µL da amostra a 30 °C durante 30 min. A reação foi interrompida através da adição de 650 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v), seguida de centrifugação a 10000 g por 15 min. A leitura da absorbância foi efetuado a 280 nm e o resultado expresso em unidades de absorbância mg<sup>-1</sup> de proteína.

A quantificação de proteínas totais presentes nos extratos foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976). Em cada 0,8 mL de amostra foram adicionados sob agitação 0,2 mL de reagente concentrado de Bradford. A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (µg proteína mL<sup>-1</sup>), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20 µg mL<sup>-1</sup>.

Com os resultados obtidos nas diferentes épocas de coleta das amostras foliares, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da produção dos compostos avaliados (enzimas), em função do tempo (coletas), conforme Soares *et al.* (2004) e os dados submetidos à análise de variância, empregando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Com relação ao efeito dos produtos químicos utilizados visando sua ação sobre a mancha bacteriana, os dados da AACPD estão apresentados na Tabela 1. Todos os valores de AACPD dos tratamentos diferiram da testemunha inoculada. Constatou-se que o melhor tratamento foi o acibenzolar-S-metil, devido ao menor valor da AACPD, seguido de piraclostrobina, piraclostrobina + methiran e oxicloreto de cobre + mancozeb.

Em relação ao indutor acibenzolar-S-metil, a redução da AACPD está correlacionado com a indução de mecanismos bioquímicos de resistência (Kessmann *et al.*, 1994), como vários trabalhos na literatura evidenciam este fenômeno (Calvacanti *et al.*, 2006; Ishida *et al.*, 2008).

Os produtos à base de cobre e oxitetraciclina tiveram resultados satisfatórios nesse experimento em relação à redução da AACPD da mancha bacteriana. Esses produtos são tradicionalmente utilizados no controle da mancha bacteriana e em outras bacterioses foliares da cultura (Miller *et*

Tabela 1. Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) da mancha bacteriana para o híbrido de tomate AP 529 tratadas com fungicidas e antibióticos. Avaliação da severidade da doença aos 8, 11, 14, 17 e 20 dias após a inoculação com *Xanthomonas perforans*.

Tratamentos	AACPD
Acibenzolar-S-metil	19,26 A*
Piraclostrobina + methiran	47,12 B
Piraclostrobina	51,24 B
Oxicloreto de cobre	84,05 C
Oxicloreto de cobre+mancozeb	58,64 B
Fluazinan	88,45 C
Oxitetraciclina	72,59 C
Testeminha inoculada	150,72 D
Testemunha sem inoculação**	0,0
CV%	25,46

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

\*\* Na testemunha sem inoculação não foi observado sintomas da doença.

*et al.*, 1998; Louws *et al.*, 2001). Segundo Marco & Stall (1983), o emprego de fungicidas do grupo dos etilenobisditiocarbamatos, como o mancozeb, em mistura com compostos cúpricos tem mostrado eficiência no controle de linhagens de *Xanthomonas* spp. que apresentam resistência ao cobre. Os autores constataram também que a combinação de fungicidas cúpricos e etilenobisditiocarbamatos no controle de doenças bacterianas mostraram ser superior quando comparado à utilização do cobre sozinho.

As doses de piraclostrobina e piraclostrobina + methiran utilizadas neste trabalho são aquelas recomendadas para o controle da pinta preta (*Alternaria solani*) e requeima do tomateiro (*Phytophthora infestans*), respectivamente, já que não há dose registrada para a mancha bacteriana. Entretanto, esses produtos mostraram-se promissores no controle da mancha bacteriana do tomateiro, nas condições em que os ensaios foram conduzidos.

Em relação às atividades enzimáticas, pode-se verificar maior produção das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e β-1,3 glucanase no experimento com inoculação da bactéria (Tabela 2). Nenhum dos genótipos de tomateiro ensaiado respondeu à produção das enzimas fenilalanina amônialiase e protease, tanto com o indutor acibenzolar-S-metil como a aplicação dos outros fungicidas e antibiótico.

O aumento significativo nas atividades das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e β-1,3 glucanase

Tabela 2. Atividade das enzimas em folhas de tomate (AP 529) tratadas com os produtos químicos e inoculadas com *Xanthomonas perforans* nos tempos de coleta de 1 dia antes, 1 dia após o tratamento, e 1, 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação. Atividade da enzima expressa em área abaixo da curva do progresso da produção dos compostos avaliados.

Tratamento	Enzimas				
	Peroxidase*	Polifenoloxidase	Fenilalanina amônia liase	$\beta$ -1,3 Glucanase	Protease
	----- AP 529 -----				
ASM	34,56 A**	12,98 A	4,23 A	371,81 A	8,69 A
P + M	33,36 A	11,36 A	4,00 A	262,18 B	7,44 A
P	41,97 A	13,53 A	4,52 A	361,68 A	8,72 A
OC	29,20 B	8,58 B	4,16 A	272,58 B	6,80 A
OC + M	29,05 B	8,02 B	3,84 A	271,60 B	6,98 A
FL	28,37 B	8,63 B	3,50 A	224,36 B	10,37 A
OX	26,80 B	7,86 B	2,27 A	258,51 B	7,17 A
TSI	24,33 B	8,98 B	4,74 A	221,41 B	8,87 A
TI	27,80 B	8,41 B	3,89 A	213,06 B	6,96 A
CV %	9,48	14,75	34,78	16,40	32,97

\* Peroxidase ( $\Delta_{\text{abs}} 470 \text{ nm min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína); Polifenoloxidase ( $\Delta_{\text{abs}} 420 \text{ nm min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína); Fenilalanina amônia liase ( $\mu\text{g}$  de ácido trans-cinâmico  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína);  $\beta$ -1,3 Glucanase ( $\mu\text{g}$  de glicose  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína); e Protease (unidades de absorvância  $\text{mg}^{-1}$  de proteína).

\*\* Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

obtidas das folhas do híbrido AP529, podem estar relacionadas com a redução da severidade da doença, verificadas pelo menor valor da AACPD, principalmente quando tratadas com acibenzolar-S-metil, piraclostrobina e piraclostrobina + methiran (Tabela 1). O papel das peroxidases, além de reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina está no aumento na produção de espécies ativas de oxigênio que apresentam ação antimicrobiana, bem como na sinalização e na indução de fitoalexinas (Bolwell *et al.*, 1995; Wojtaszek, 1997; Kristensen *et al.*, 1999). A polifenoloxidase catalisa a oxidação de fenóis para quinonas, na presença de oxigênio. A expressão dessa enzima pode atuar como uma linha de defesa adicional na proteção de plantas a ataques de patógenos e insetos (Thipyapong *et al.*, 1997). Já as  $\beta$ -1,3 glucanase liberam fragmentos glicosídicos, tanto do patógeno, quanto da própria parede celular da planta, os quais podem atuar como elicitores de defesa do hospedeiro (Cutt e Klessig, 1992).

Pesquisas com acibenzolar-S-metil e Ecolife® têm evidenciado a ação desses produtos no controle da mancha bacteriana em tomateiro e também na

ativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. O aumento na atividade dessas enzimas foi correlacionado com a resistência induzida, sendo produzidas algumas horas após a pulverização e até 12 dias após (Cavalcanti *et al.*, 2006). Trabalhos com piraclostrobina na defesa de plantas contra alguns fitopatógenos tem sido relatados por Herms *et al.* (2002), na qual demonstraram que piraclostrobina aumentou a resistência de fumo contra a infecção causada pelo vírus do mosaico do fumo (TMV) e por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Houve acúmulo de ácido salicílico nos tecidos das plantas tratadas e de PR – 1 proteínas, indicando que piraclostrobina age ativando mecanismos de defesas nas plantas, além da ação fungicida.

Já os resultados das atividades enzimáticas de plantas tratadas e não inoculadas com a bactéria *X. perforans* estão na Tabela 3. Pode-se verificar um aumento das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e  $\beta$ -1,3 glucanase nos tratamentos com acibenzolar-S-metil, piraclostrobina + metiram e piraclostrobina. Resultados semelhantes das atividades destas enzimas foram obtidos no ensaio com inoculação com a bactéria (Tabela 2), podendo observar que mesmo na ausência da inoculação, esses produtos induziram a atividade enzimática nas plantas.

Tabela 3. Atividade das enzimas em folhas de tomate (AP 529) tratadas com os produtos químicos e não inoculadas nos tempos de coleta de 1 dia antes do tratamento e 2, 4, 5, 7 e 9 dias após o tratamento. Atividade expressa em área abaixo da curva do progresso da produção dos compostos avaliados.

Tratamento	Enzimas				
	Peroxidase*	Polifenoloxidase	Fenilalanina amônia liase	$\beta$ -1,3 Glucanase	Protease
	AP 529				
ASM	37,12 A**	12,75 A	4,63 A	233,51 A	9,05 A
P	36,66 A	12,28 A	6,58 A	280,98 A	11,40 A
P + M	41,75 A	13,44 A	5,72 A	307,84 A	7,45 A
OX	32,71 B	9,98 B	6,65 A	174,06 B	6,69 A
FL	30,04 B	7,62 B	6,20 A	195,20 B	8,69 A
TSI	26,67 B	9,24 B	5,10 A	198,08 B	5,83 A
CV%	10,56	17,77	20,26	18,98	21,89

\* Peroxidase ( $\Delta_{\text{abs}} 470 \text{ nm min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína); Polifenoloxidase ( $\Delta_{\text{abs}} 420 \text{ nm min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína); Fenilalanina amônia liase ( $\mu\text{g}$  de ácido trans-cinâmico  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína);  $\beta$ -1,3 Glucanase ( $\mu\text{g}$  de glicose  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína); e Protease (unidades de absorvância  $\text{mg}^{-1}$  de proteína)

\*\* Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Plantas que alocam seus recursos em defesa na ausência de patógenos podem arcar com custos que refletirão na produtividade, uma vez que as alterações metabólicas que levam à resistência possuem um custo adaptativo associado, o qual pode pesar mais do que o benefício (Iriti e Faoro, 2003). Em algumas pesquisas envolvendo indução de resistência em diferentes sistemas hospedeiro-patógenos, têm-se observado um ganho de produtividade, fato que indica um custo menor do que o benefício. Porém, em outros casos, não há incrementos na produtividade, ou até há redução da mesma, ainda com drástica redução da doença (Godard *et al.*, 1999; Dietrich *et al.*, 2005).

Na busca para elucidar este fato Kuhn e Pascholati (2010) avaliaram as atividades de peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3 glucanase, síntese de lignina e compostos fenólicos, correlacionando-os com o crescimento do feijoeiro expressando resistência induzida contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, tratadas por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus* aplicados ao longo do ciclo da cultura e na ausência do patógeno. Os resultados obtidos foram que o acibenzolar-S-metil aumentou a atividade de peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3 glucanase, enquanto

que o *B. cereus* aumentou apenas a peroxidase. O acibenzolar-S-metil reduziu a biomassa da planta, o que não ocorreu em plantas tratadas por *B. cereus*. Os autores concluíram que a resistência induzida por acibenzolar-S-metil apresenta elevado custo associado, enquanto que por *B. cereus* apresenta baixo custo, necessitando a indução de resistência ser melhor explorada e estudada para potencializar seu uso em feijoeiro.

Os resultados em relação ao acibenzolar-S-metil corroboram com os obtidos neste trabalho, fato visto pela indução das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e  $\beta$ -1,3 glucanase.

Os produtos à base de piraclostrobina juntamente com acibenzolar-S-metil induziram as atividades enzimáticas de peroxidase, polifenoloxidase e  $\beta$ -1,3 glucanase, evidenciando que estes produtos podem estar relacionados à indução de resistência à mancha bacteriana em plantas de tomateiro.

### Agradecimentos

À CAPES e à FAPESP, pelo auxílio financeiro recebido para o desenvolvimento deste trabalho.

## Literatura Citada

- Abeles, F.B.; Foence, L.E.  
1970 Temporal and hormonal control of  $\beta$ -1,3 glucanase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 45: 395-400.
- Bolwell, Gp.; Butt, Vs.; Davies, Dr.; Zimmerlin, A.  
1995 The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23: 517-532.
- Bradford, M.  
1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Camargo Filho, W.P.; Mazzei, A.R.  
1996 Necessidade de Reconversão da Produção de Tomate em São Paulo: ações na cadeia produtiva. *Informações Econômicas* 26 (6): 105-115.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V.  
1990 *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York. John Wiley & Sons.
- Cavalcanti, F.R.; Resende, M.L.V.; Pereira, R.B.; Costa, J.C.B.C.; Carvalho, C.P.S.  
2006 Atividades de quitinase e  $\beta$ -1,3 glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 1721-1730.
- Cutt, J.R.; Klessig, D.F.  
1992. Pathogenesis-related proteins In: Boller T, Meins F. Plant gene research: Genes involved in plant defense. Wien. Springer-Verlag, pp. 209-243.
- Dietrich, R.; Ploss, K.; Heil, M.  
2005 Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. *Plant Cell and Environment* 28: 211-222.
- Duangmal, K.; Apenten, R.K.O.  
1999 A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var Romano). *Food Chemistry* 64: 351-359.
- Ferreira, D.F.  
2000 Sistema de análises de variância para dados balanceados Lavras. UFLA.
- Fialho, M.B.  
2004 Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa* agente causal de pinta preta dos citros. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Filgueira, F.A.R.  
2008 *Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*, 3ª ed. Viçosa. UFV.
- Godard, J.F.; Ziadi, S.; Monot, C.; Le Corre, D.; Silué, D.  
1999 Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection* 18: 397-405.
- Hermes, S.; Seehaus, K.; Koehle, H.; Conrath, U.  
2002 A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiology* 130: 120-127.
- Iriti, M.; Faoro, F.  
2003 Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology* 151: 171-180.
- Ishida, A.K.N.; Souza, R.M.; Resende, M.L.V.; Cavalcanti, F.R.; Oliveira, D.L.; Pozza, E.A.  
2008 *Rhizobacterium* and acibenzolar-S-methyl (ASM) in resistance induction against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. *Tropical Plant Pathology* 33: 27-34.
- Kessman, H.T.; Staub, T.; Hofmann, C.; Maetzke, T.; Herzog, J.; Ward, E.; Uknes, S.; Ryals, J.  
1994 Inductions of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32: 439-459.
- Köehle, H.; Grossmann, K.; Jabs, T.; Stierl, R.; Gerhard, M.; Kaiser, W.; Glaab, J.; Conrath, U.; Seehaus, K.; Herms, S.  
2002 Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants In: Lyr H, Russell PE, Dehne H-W, Sisler HD (Eds), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*, pp. 61-74.
- Kristensen, B.K.; Bloch, H.; Rasmussen, S.K.  
1999 Barley coleoptile peroxidases Purification molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiology* 120: 501-512.
- Kuhn, O.J.; Pascholati, S.F.  
2010. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas síntese de fenóis e lignina e biomassa. *Summa Phytopathologica* 36 (2):107-114.
- Kurozawa, C.; Pavan, M.A.  
2005 Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds), *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*, 4 ed. São Paulo. Editora Ceres. pp. 607-626.
- Lewis, M.L.I.; Mera, J.R.; Miller, S.A.  
2008 Evaluation of fungicides and bactericides for the control of foliar and fruit diseases of processing tomatoes. Disponível em: <<http://www.ag.ohio-state.edu/~vegnet/library/res04/tomato.pdf>>. Acesso em: 4 out. 2008.
- Lopes, C.A.; Quezado-Duval, M.A.  
2005 Doenças bacterianas In: Lopes, C.A.; Ávila, A.C. (Ed.) *Doenças do tomateiro*, 2 ed. Brasília. Embrapa-CNPq, pp. 62-64.
- Louws, F.J.; Wilson, M.; Campbell, H.L.; Cuppels, D.A.; Jones, J.B.; Shoemaker, P.B.; Sahin, F.; Miller, S.A.  
2001 Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease* 85 (5): 481-488.
- Lusso, M.F.G.; Pascholati, S.F.  
1999 Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica* 25: 244-249.
- Marco, G.M.; Stall, R.E.  
1983 Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67 (7): 779-781.
- Mello, S.C.M.; Takatsu, A.; Lopes, C.A.  
1997 Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 22: 447-448.
- Miller, S.A.; Sahin, F.; Denning, A.; Koton, R.; Abbasi, P.  
1997 Management of Bacterial spot of tomato. *Biological and Cultural Test* 13 (34):108.

- Quezado-Duval, A.M.; Leite Júnior, R.P.; Lopes, C.A.; Lima, M.F.; Camargo, L.E.A.  
2005 Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695: 101-108.
- Romeiro, R.S.  
2008 Indução de resistência em plantas a patógenos In: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Orgs), Interação planta-patógeno: fisiologia e biologia molecular. Piracicaba. Fealq, pp. 411-429.
- Romeiro, R.S.  
2001 *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: UFV.
- Silva, J.B.C.; Giordano, L.B.  
2000 Produção mundial e nacional In: Silva, J.B.C.; Giordano, L.B. (Ed), Tomate para processamento industrial. Brasília. *Embrapa Hortaliças*, pp. 8-11.
- Silva, L.H.C.P.  
2002 Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro, 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Silva-Lobo, V.L.; Giordano, L.B.; Lopes, C.A.  
2005 Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 30: 343-349.
- Soares, R.M.; Maringoni, A.C.; Lima, G.P.P.  
2004 Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. *Fitopatologia Brasileira* 29 (4): 373-377.
- Sobrinho, C.A.; Ferreira, P.T.; Cavalcanti, L.S.  
2005 Indutores abióticos. In: Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. (Eds), Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. *Piracicaba*. Fealq, pp. 51-80.
- Thipyapong, P.; Steffens, J.C.  
1997 Tomato polyphenol oxidase: differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology* 115: 409-418.
- Umesha, S.  
2006 Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica* 34 (1): 68-71.
- Venancio, W.S.; Rodrigues, M.A.T.; Begliomini, E.; Souza, N.L.  
2003 Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. *Publicatio UEPG* 9: 59.68.
- Vigo-Schultz, S.C.  
2008 Avaliação da indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijão vagem. 78 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- Wojtaszek, P.  
1997 Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemistry Journal*, 322: 681-692.