

Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na Indução de Respostas de Defesa do Tomateiro Contra a Mancha Bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*)

Fábio Rossi Cavalcanti¹, Mário Lúcio V. Resende², Ana B. Zacaroni², Pedro M. Ribeiro Júnior², João de Cássia B. Costa³ & Ricardo M. de Souza²

¹Campus Professora Cinobelina Elvas, Universidade Federal do Piauí, CEP 54900-000, Bom Jesus, PI; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, e-mail: mlucio@ufla.br; ³CEPLAC/CEPEC/Seção de Fitopatologia, Cx. Postal 07, CEP 45650-000, Itabuna, BA

(Aceito para publicação 15/09/2006)

Autor para correspondência: Mário Lúcio V. de Resende

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JÚNIOR, P.M., COSTA, J.C.B. & SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). Fitopatologia Brasileira 31:372-380. 2006.

RESUMO

Foi investigada a eficácia comparativa da pulverização foliar em tomateiro de acibenzolar-S-metil (ASM) e Ecolife® na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, bem como avaliada a ativação de algumas respostas bioquímicas de defesa de planta. Plantas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram pulverizadas com acibenzolar S-metil (0,2 g l⁻¹ ASM) e uma formulação natural proveniente de biomassa cítrica denominada Ecolife® (5 ml l⁻¹). Quatro dias após as pulverizações, as plantas foram inoculadas com um isolado patogênico de *Xanthomonas vesicatoria*. Em experimentos de quantificação de doença, a pulverização foliar de Ecolife® e ASM conferiu 39,2% e 47,7% de proteção, respectivamente. A resistência induzida em plantas pulverizadas com ASM e Ecolife® foi evidenciada pelo aumento da atividade de peroxidases (POX) e oxidases de polifenóis (PPO), iniciado logo às primeiras horas após as pulverizações, continuando até 12 dias de avaliação. A despeito da tendência de queda nas atividades de amônia-liases de fenilalanina (PAL) a partir de 3 dias após as pulverizações, plantas tratadas com ASM e Ecolife® tiveram discreto aumento no acúmulo de lignina, principalmente aquelas pulverizadas com Ecolife® e inoculadas com *X. vesicatoria*. Teores de fenóis solúveis totais decresceram significativamente, 9 e 12 dias após pulverizações. O aumento nas atividades de POX e PPO poderia resultar em lignificação, a qual estaria associada a uma estratégia de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana.

Palavras-chave adicionais: Resistência sistêmica adquirida, peroxidases, oxidases de polifenóis, amônia-liases de fenilalanina, conteúdo de fenólicos, lignina.

ABSTRACT

Acibenzolar-S-methyl and Ecolife® in the induction of defense responses in tomato against bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*)

The efficacy of acibenzolar-S-methyl (ASM) and Ecolife® and the activation of some defense responses against *Xanthomonas vesicatoria* were investigated in the current work. Tomato plants cv. Santa Cruz Kada were sprayed with acibenzolar S-methyl (0.2 g l⁻¹ ASM and a citric biomass formulation called Ecolife® (5 ml l⁻¹). Plants were challenged with a virulent *Xanthomonas vesicatoria* isolate four days after spraying. Foliar pulverization of Ecolife® and ASM caused disease reduction of 39.2% and 47.7%, respectively. The expression of resistance induced by ASM and Ecolife® was evidenced by the increase at peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) activities, starting in the first hours after spraying. Despite the slight decrease in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity three days after spraying, plants treated with ASM or Ecolife® and inoculated with *X. vesicatoria* showed a slight increase in lignin deposits. The content of total soluble phenolic compounds decreased significantly at 9 and 12 days after spraying. Increased POX and PPO activities might result in lignification, which may be associated with the tomato's defense strategy against bacterial leaf spot.

Additional keywords: Systemic acquired resistance, peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, phenolic content, lignin.

INTRODUÇÃO

A infecção causada por *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995

(Xv), agente etiológico da mancha bacteriana do tomateiro, acarreta perdas consideráveis na produtividade e na qualidade do fruto (Al-Dahmani *et al.*, 2003). Atualmente, a mancha bacteriana é considerada uma das doenças bacterianas mais difundidas no país, sendo encontrada em praticamente todas as regiões produtoras de tomate. O controle químico para essa bacteriose, com a aplicação de antibióticos e fungicidas, tem

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras. 2005.

sido pesquisado, entretanto, devido ao rápido aumento da quantidade de inóculo e fácil disseminação do patógeno, em muitos casos, não tem sido eficiente (Maringoni *et al.*, 1986; Araújo *et al.*, 2003). Nesse contexto, indutores de resistência constituem uma alternativa para o manejo integrado dessa doença (Hammond-Kosack & Parker, 2003).

Infecção por patógenos resulta em um grande número de alterações fisiológicas e moleculares nas plantas. A resposta hipersensitiva (RH) é uma forma de morte celular programada em plantas desafiadas por um patógeno incompatível (Hammond-Kosack & Parker, 2003). A RH é caracterizada pela formação de pequenas lesões necróticas e sinalização molecular na ativação de respostas sistêmicas de defesa contra o ataque subsequente da mesma espécie de patógeno, ou de outras espécies (Ryals *et al.*, 1994). Este evento sistêmico subsequente, conhecido como resistência sistêmica adquirida (RSA), possui uma função central na resistência das plantas a patógenos.

A RSA promove uma série de alterações bioquímicas e estruturais, destacando-se o acúmulo de ácido salicílico e espécies reativas de oxigênio, reforço de parede celular por lignificação (Anterola & Lewis, 2002), aumento na atividade de enzimas relacionadas a vias secundárias do metabolismo e síntese de fitoalexinas (He *et al.*, 2002). Além disso, a RSA está primariamente associada à expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese, PRP's (Okushima *et al.*, 2000). Assim, a RSA envolve múltiplos eventos bioquímicos e fisiológicos compondo um mecanismo de resistência induzida contra a infecção. Ao mesmo tempo, patógenos desenvolveram estratégias de adaptação para sobrepor a indução de resistência sistêmica (Malamy *et al.*, 1996).

Indutores de resistência à base de acibenzolar-S-metil (ASM) têm sido exaustivamente estudados nos últimos anos como indutores químicos de resistência, contra fungos, vírus e bactérias (Resende *et al.*, 2002). Ecolife®, um produto comercial originado de biomassa cítrica, ou segundo o fabricante, uma formulação aquosa heterogênea contendo polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos orgânicos diluídos, tem se mostrado eficaz na proteção de pepino, cafeeiro e cacauero.

No presente trabalho foi investigada e comparada a eficácia da pulverização foliar de Bion® (ASM comercial) e Ecolife®. Objetivou-se, para tanto, avaliar a proteção contra *X. vesicatoria* induzida pelos ativadores estudados, bem como o efeito destes no crescimento vegetativo, lignificação, conteúdo de fenóis solúveis totais e o envolvimento de algumas enzimas relacionadas à defesa, tais como amônia-liases de fenilalanina (PAL, EC 4.3.1.5), peroxidases (POX; EC 1.11.1.7) e oxidases de polifenóis (PPO, 1.10.3.2), em plantas de tomate, cultivadas em casa-de-vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Em experimentos conduzidos em casa-de-vegetação

visando a proteção contra a mancha bacteriana, plântulas de tomateiro, cv. Santa Cruz Kada foram mantidas em recipientes de 3 litros em substrato composto de areia, matéria orgânica seca e vermiculita (2:1:1). O experimento, foi delineado em blocos inteiramente casualizados, com 5 blocos, sendo considerado como unidade experimental, 1 recipiente contendo 4 plantas.

Para o experimento de coleta de tecido foliar fresco visando determinações bioquímicas, sementes de tomate, cv. Santa Cruz Kada, foram imersas em álcool etílico a 1% v/v e hipoclorito de sódio 0,1% v/v, por um minuto, e então lavadas com água destilada e germinadas em recipientes de 400 mL, contendo areia textura média exaustivamente lavada e esterilizada. Após a emergência, as plântulas foram regadas diariamente com 1/10 da solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com média de temperatura dia/noite de 28/24°C, umidade relativa de 53/85%, fotoperíodo de 12 horas, aproximadamente, e uma média de densidade máxima de fluxo de fótons de 310-400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medidos ao nível da planta (IRGA modelo LCA-4, Hoddesdon, UK). O experimento foi instalado em blocos casualizados, com três blocos e unidade experimental com um recipiente de 400 mL, contendo uma única planta.

ASM e Ecolife®

Acibenzolar S-metil (ASM) foi utilizado a partir do produto comercial Bion®, fornecido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, SP. A diluição experimental foi fixada em 0,2 g l⁻¹ ASM.

Ecolife® foi fornecido pela Quinabra, Química Natural Brasileira, São José dos Campos, SP. A dosagem estimada para pulverização em folhas de tomateiro (5 mL L⁻¹ Ecolife® L⁻¹) foi baseada em experimentos preliminares para acompanhamento de fitotoxidez, em concordância com as recomendações de dosagem do fabricante.

Obtenção do inóculo e inoculação

O isolamento de *X. vesicatoria* foi feito a partir de folhas naturalmente infectadas de tomateiro, em meio 523 de Kado & Heskett (1970) (MB1), pela técnica das estrias paralelas. Posteriormente a bactéria foi cultivada no mesmo meio a 28°C durante 12 h, para o preparo de suspensões para inoculações. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540} = 0,20$, correspondendo a aproximadamente 10¹¹ ufc L⁻¹.

A inoculação foi realizada via pulverização foliar em plantas de tomate com 20 dias da semeadura, até o ponto de escorrimento. A seguir, as plantas foram transferidas para câmara úmida a 28°C, onde permaneceram por 12 h, sendo, em seguida, transportadas de volta à casa de vegetação.

Inibição *in vitro* do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*

Ensaio de inibição *in vitro* do crescimento de *X. vesicatoria* foram realizados com as substâncias estudadas,

nas mesmas concentrações utilizadas nos testes em planta, utilizando-se sulfato de estreptomicina 1000 ppm e água estéril, como testemunhas. Todas as substâncias foram filtradas em membrana Millipore de 0,22 µm e submetidas ao teste, seguindo metodologia de Samy *et al.* (1999), adaptada. Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram embebidos (2x) com 20µl de cada tratamento e, após secagem, foram transferidos para o meio MB1 (Kado & Heskett, 1970) sólido em placa de Petri, ao qual fora previamente incorporado 0,1 mL da suspensão ($A_{540} = 0,20$) de Xv. Os halos de inibição foram avaliados 48 h após a incubação.

Quantificação de doença e coleta de material fresco

Plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada com 15 dias da sementeira foram pulverizadas com ASM (0,2 g l⁻¹) e Ecolife® (5 mL L⁻¹), até o ponto de escorrimento. Após quatro dias, plantas pulverizadas com os tratamentos e pulverizadas com água destilada (controle), foram inoculadas com a suspensão de Xv e avaliadas aos 3, 6, 9, 12, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI). Para se avaliar a eficiência dos extratos testados na proteção de plantas, foi adaptada uma escala de notas baseada em Sidhu & Webster (1977). A severidade de doença foi quantificada por meio de análise visual convertida em porcentagem de severidade, seguindo-se uma escala (1-4) de área lesionada: 1: 0-25 % da área foliar lesionada; 2: 26-50 % da área foliar lesionada; 3: 51-75 % da área foliar lesionada; 4: >75 % da área foliar lesionada. Para o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD) utilizou-se a seguinte fórmula: $AACPD = \sum ((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$, onde Y representa a intensidade da doença, t o tempo e i o número de avaliações no tempo (Campbell & Madden, 1990). A proteção de planta foi estimada pela relação: (1-x/y), onde x representa AACPD das plantas tratadas e y, AACPD dos controles inoculados (Li *et al.*, 1996).

Para determinações bioquímicas, plantas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, 15 dias após a sementeira, foram pulverizadas com ASM (0,2 g l⁻¹) e Ecolife® (5 mL L⁻¹) até o ponto de escorrimento. Amostras de plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água (controle) foram coletadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após pulverizações (HAP), continuando em 3, 6, 9 e 12 dias após as pulverizações (DAP). Tratamentos pulverizados e inoculados foram coletados somente em 6, 9 e 12 DAP. A inoculação com a suspensão de Xv foi conduzida 4 DAP em plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água destilada. Antes de cada coleta, às 9:00 h, as plantas foram transferidas para uma câmara ajustada para 27°C, 75% de umidade relativa e 230 µmol m⁻² s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons, por 1 hora. Em seguida, as folhas foram coletadas, homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente utilizadas para as determinações bioquímicas.

Determinações enzimáticas

O tecido foliar foi homogeneizado por meio de almofariz e pistilo em 3 mL de tampão acetato de sódio 50

mM pH 5,2 contendo EDTA 0,1 mM durante 5 min em banho de gelo. Após a filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 13000 x g por 15 min e o sobrenadante foi recuperado. Todos os passos foram executados a 0-4°C. A proteína solúvel contida nos sobrenadantes foi aferida pelo ensaio de Bradford (1976), usando um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de peroxidases de guaiacol (atividade de POX) foi determinada pela adição de 25µl do extrato enzimático ajustado para 2 mL de uma solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20mM e peróxido de hidrogênio 20 mM. Após incubação em 30°C por 10 min, a absorbância foi medida a 480 nm (Urbanek *et al.*, 1991). Uma unidade de POX foi expressa como variação de 1 OD₄₈₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta 480\text{nm mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$). A atividade de oxidases de polifenóis (PPO) foi determinada pela adição de 50µl do extrato enzimático ajustado para 3 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5 e pirocatecol a 25 mM. Após 10 min a 30°C, foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (Gauillard *et al.*, 1993). Uma atividade de PPO foi expressa pela variação de 1 OD₄₁₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta 410\text{nm mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$). A atividade de amônia-liases de fenilalanina (PAL) foi determinada seguindo método adaptado por Mori *et al.* (2001), onde 200 µl do extrato enzimático, previamente dialisado por aproximadamente 16 h contra tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, foram misturados a uma solução contendo 200µl de fenilalanina 40 mM, 20µl de β-mercaptoetanol 50 mM e 480µl de Tris-HCl 100 mM, pH 8,8. Após incubação a 30°C por 1 h, a reação foi interrompida com a adição de 100 µl de HCl 6N e a absorbância a 290 nm foi medida. A quantidade de ácido *trans*-cinâmico formado foi dosada por comparação com uma curva padrão (0,01-0,1 µg de ácido *trans*-cinâmico mL⁻¹), e os valores foram convertidos e expressos em pKat mgP⁻¹.

Eletroforese em gel de poliácridamida, em condições nativas, foi realizada usando-se um gel de separação de 12,5 % sobreposto por um gel de empilhamento de 5 %. Extratos enzimáticos foram preparados em presença de azul de bromofenol e glicerol. Um volume referente a um valor fixo de 15 µg de proteína de cada amostra foi adicionado aos poços do gel de empilhamento. Para revelação de peroxidases, ao fim da corrida eletroforética, o gel foi imerso em 20 mL de uma solução contendo 10 mg de diaminobenzidina, 1 mL de tampão Tris-HCl 2M, pH 8,3, 0,02 mL de peróxido de hidrogênio 30% e água Milli-Q (q.s.p. 20 mL). 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.

Determinação de fenóis totais e lignina

A determinação colorimétrica de fenóis totais foi baseada no procedimento de Spanos & Wrolstad (1990),

onde 100 µl do extrato bruto foram adicionados a uma solução contendo 900 µl de água destilada, 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 (v/v) e 4 mL de Na₂CO₃, 7,5 % (p/v). Os tubos foram então agitados e incubados por 1 h. A absorbância da solução foi medida em 765 nm e a quantificação foi baseada em uma curva padrão (100, 200, 300, 400 e 500 mg l⁻¹ de tirosina) preparada em seguida ao ensaio. Os valores foram convertidos e expressos em µg mg⁻¹ de matéria fresca (MF).

Para a quantificação de lignina foi utilizado o ensaio de Monties (1989), com modificações. Uma alíquota de 0,2 mg de tecido foliar fresco foi homogeneizada, incubada com acetona PA 85% por 48 h, e centrifugada a 7500 x g por 15 min. O precipitado foi seco e incubado com 5 mL de ácido tioglicólico (SIGMA) em HCl 2 N 1:10 (v/v), durante quatro horas. Amostras foram então centrifugadas a 7500 x g por 15 min duas vezes e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos onde receberam 200 µl de HCl 10 N. Após o banho de gelo de 4 h e uma centrifugação de 7500 x g por 30 minutos, o *pellet* obtido foi homogeneizado em 5 mL de NaOH 0,5 N e a absorbância foi medida a 280 nm. A quantidade de derivados TGA (lignina ácido-solúvel) formada foi medida pela comparação com uma curva padrão (0,01-0,1 mg éter 2-hidroxipropílico mL⁻¹) e os valores foram convertidos e expressos em µg mg⁻¹ MF. Todas as determinações foram realizadas em duplicatas a partir de uma mesma amostra experimental.

Análises estatísticas

Estatística descritiva, análise de variância, testes F e Tukey foram calculados utilizando-se o procedimento *General Linear Model* (GLM) do SAS (*Statistical Analysis System Inc.*, Cary, NC, USA). Teste t de student (LSD) ao nível de significância de 5% foi calculado com o auxílio do SISVAR (© Daniel Furtado Ferreira, 2003. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil). No presente trabalho, todos os experimentos foram repetidos, sendo incorporados apenas os resultados reiteradamente observados.

RESULTADOS

Efeito da pulverização foliar de ASM e Ecolife® sobre a severidade da mancha bacteriana e sobre o desenvolvimento das plantas em casa-de-vegetação

Nas condições de casa de vegetação, os primeiros sintomas de mancha bacteriana nas folhas das plantas inoculadas, pré-tratadas ou não, foram detectados cerca de 50 horas após a inoculação. Entretanto, as lesões presentes não superaram 40% da área total do limbo, em média, correspondendo a uma pontuação "2" da escala de Sidhu & Webster (1977). De um modo geral, em plantas pré-tratadas com as substâncias testadas, os valores de severidade da doença atingiram um patamar máximo aos 9 DAI (dias após a inoculação com Xv) e não progrediram nos dias subsequentes da avaliação até 20 DAI. Considerando o experimento de quantificação de doença,

enquanto ASM promoveu uma proteção de 47,7%, plantas pulverizadas por Ecolife® atingiram 39,2% (Figura 1).

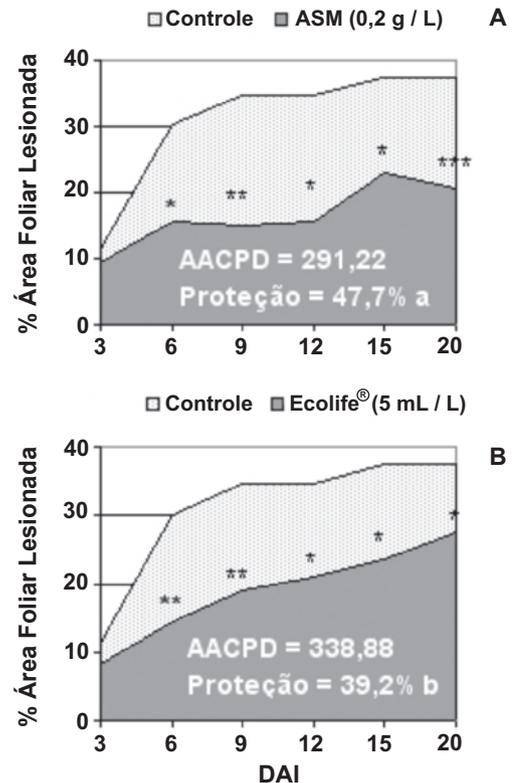


FIG. 1 - Eficácia de A. ASM (0,2 g l⁻¹) e B. Ecolife® (5 mL l⁻¹) na redução da área abaixo da curva de progresso (AACPD) da mancha foliar causada por *Xanthomonas vesicatoria* em tomate cv. Santa Cruz Kada. Asteriscos referem-se a diferenças significativas a (*) P=0,05, (**) P=0,01 e (***) P=0,001 entre controle e tratamentos, de acordo com teste t de Student (LSD), em cada dia de avaliação. Legendas inseridas nos gráficos apresentam o valor das respectivas AACPDs e percentagens de proteção do tomateiro, 20 dias após inoculação (DAI) e 6 avaliações. Percentagens de proteção seguidas das mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

O crescimento das plantas pulverizadas com ASM não diferiu do crescimento das plantas-controle (sadias). No entanto, em tomateiro pulverizado com Ecolife®, foi evidenciada significativa redução no crescimento da parte aérea, tanto na taxa relativa de crescimento (1,12 cm dia⁻¹, contra 2,10 cm dia⁻¹ das plantas sadias e 2,07 cm dia⁻¹ das plantas pulverizadas com ASM e inoculadas), quanto no acúmulo de massa fresca de copa (14,35g contra 24,05g das plantas sadias e 21,93g das plantas pulverizadas com ASM, por copa) aos 20 DAI (35 dias após semeadura).

Considerando os efeitos *in vitro* das substâncias testadas sobre o crescimento radial de *X. vesicatoria*, Ecolife® e sulfato de estreptomicina (controle) inibiram significativamente o crescimento da bactéria (respectivamente 13,8 ± 0,83 mm e 20,8 ± 0,83 mm).

Efeito da pulverização foliar de ASM e Ecolife® sobre atividades de enzimas relacionadas à patogênese, deposição de lignina e conteúdo de fenóis solúveis totais

Plantas de tomateiro pulverizadas com ASM e Ecolife®, sem inoculação com Xv (Figura 2A, -□- e -■-, respectivamente) mostraram aumento significativo ($P \leq 0,05$) na atividade de POX em folhas, a partir de 4 horas após pulverização (HAP), em relação aos controles (Figura 2A, -○-). Em plantas pulverizadas com Ecolife®, um marcante aumento da atividade de POX, cerca de 4 vezes os respectivos controles, foi observado dentro do intervalo 8-24 HAP (Figura 2A, -■-), seguido de queda em 48 HAP. A atividade de PPO em folhas de plantas de tomate pulverizadas com ASM e Ecolife® (Figura 2B, -□- e -■-, respectivamente), no intervalo de tempo 48 HAP, mostrou uma leve tendência de crescimento, não significativo em relação aos controles (Figura 2B, -○-).

A atividade de POX, PPO e PAL foi também

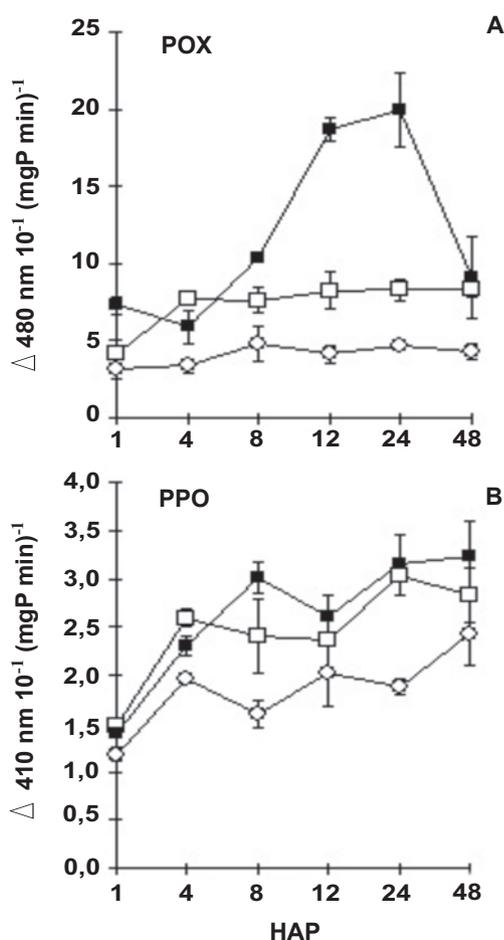


FIG. 2 - A. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX); B. oxidases de polifenóis (PPO) em folhas de tomateiro, cv. Santa Cruz Kada, susceptível a *Xanthomonas vesicatoria*, após pulverização com água (controle, -○-), água + inoculação (controle, -●-), ASM ($0,2 \text{ g L}^{-1}$, -□-) e Ecolife® (5 mL L^{-1} , -■-). Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após pulverização (HAP). Barras de erros indicam o desvio padrão.

monitorada entre 3 e 12 DAP (dias após a pulverização) em plantas tratadas com ASM (Figura 3) e Ecolife® (Figura 4). Surpreendentemente, neste intervalo a atividade de POX em

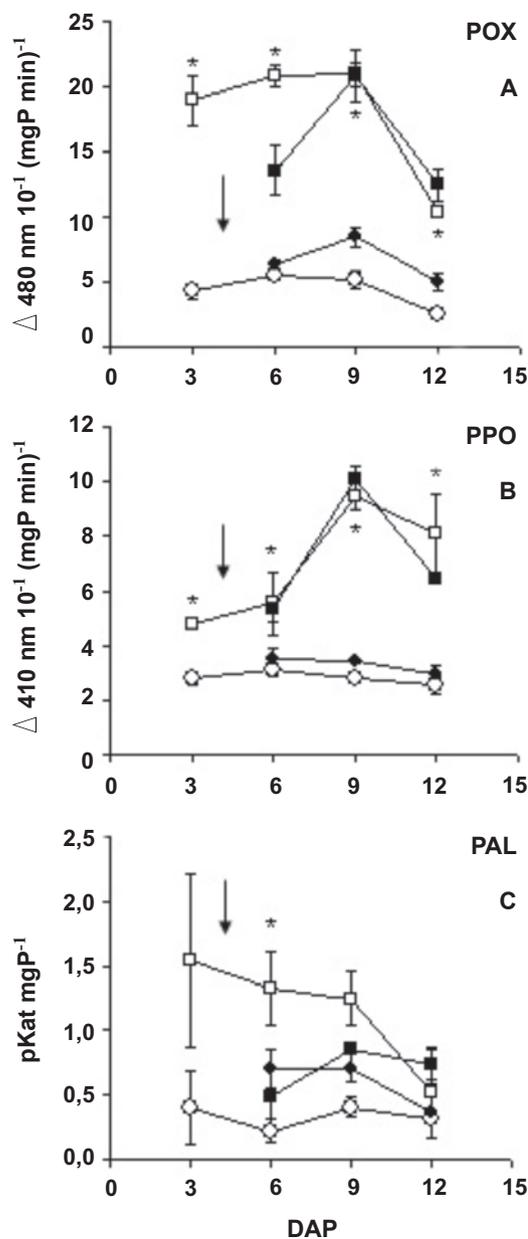


FIG. 3 - A. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX), B. oxidases de polifenóis (PPO) e C. amônia liases de fenilalanina (PAL) em folhas de tomateiro, cv. Santa Cruz Kada, susceptível a *Xanthomonas vesicatoria*, após pulverização com água (controle, -○-), água + inoculação (controle, -●-), ASM ($0,2 \text{ g L}^{-1}$, -□-) e ASM + inoculação (-■-). Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 (plantas pulverizadas e inoculadas) dias após pulverização (DAP). Seta indica inoculação com *X. vesicatoria* a 4 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão. Dentro de cada dia de avaliação, asteriscos indicam diferença significativa em comparação com o controle, de acordo com o teste t (LSD) ($P \leq 0,05$).

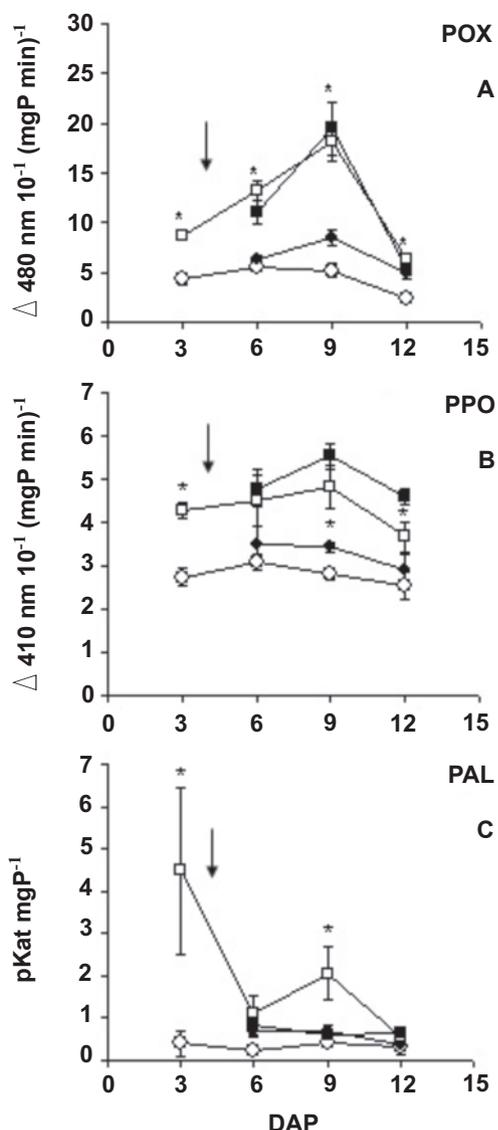


FIG. 4 - A. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX), B. oxidasas de polifenóis (PPO) e C amônia liases de fenilalanina (PAL) em folhas de tomateiro, cv. Santa Cruz Kada, susceptível a *Xanthomonas vesicatoria*, após pulverização com água (controle, -○-), água + inoculação (controle, -●-), Ecolife® (0,2 g L⁻¹, -□-) e Ecolife® + inoculação (-■-). Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 (plantas pulverizadas e inoculadas) dias após pulverização (DAP). Seta indica inoculação com *X. vesicatoria* a 4 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão. Dentro de cada dia de avaliação, asteriscos indicam diferença significativa em comparação com o controle, de acordo com o teste t (LSD) (P ≤ 0,05).

plantas pulverizadas com ASM (Figura 3A, -□-), e plantas pulverizadas com ASM e inoculadas (Figura 3A, -■-) experimentaram um abrupto incremento em seus valores, atingindo cerca de 3 vezes aqueles medidos no intervalo entre 4 e 48 HAP, e muitas vezes mais altos que as respectivas plantas (controles) pulverizadas com água (Figura 3A, -○-) e pulverizadas com água e inoculadas (Figura 3A, -●-). A

atividade de PPO em plantas pulverizadas com ASM seguiu a mesma tendência geral das respostas de POX, tanto em plantas apenas pulverizadas, quanto em plantas pulverizadas e inoculadas (Figura 3B), principalmente a 9 e 12 DAP. De maneira semelhante, plantas tratadas com Ecolife® seguiram a mesma tendência das tratadas com ASM, em termos de atividade de POX e PPO (Figura 4), com a ressalva de que os contrastes foram menores entre plantas apenas pulverizadas e pulverizadas e inoculadas, e seus respectivos controles, sem, no entanto, deixarem de ser significativos (p ≤ 0,05). Importante salientar que, da mesma forma como observado em plantas tratadas com ASM, plantas inoculadas com Xv, 4 dias após a pulverização com Ecolife® não diferiram daquelas apenas pulverizadas com Ecolife® (ou ASM), sugerindo falta de indução associada à bactéria, dentro da interação planta-patógeno em estudo (Figuras 3 e 4).

Atividade de POX, revelada em géis de poliácridamida, a partir de amostras provenientes de plantas tratadas com ASM e Ecolife® (Figura 5, A e B), mostraram um perfil semelhante de bandas, com a revelação de quatro isoformas constitutivas. Amostras de plantas tratadas com ASM (Figura 5A) mostraram um perfil de bandas com possivelmente cinco isoformas ativas. O aumento da densidade de zonas reveladas em gel está de acordo com os resultados das atividades colorimétricas.

Plantas pulverizadas com Ecolife® e inoculadas 4 dias

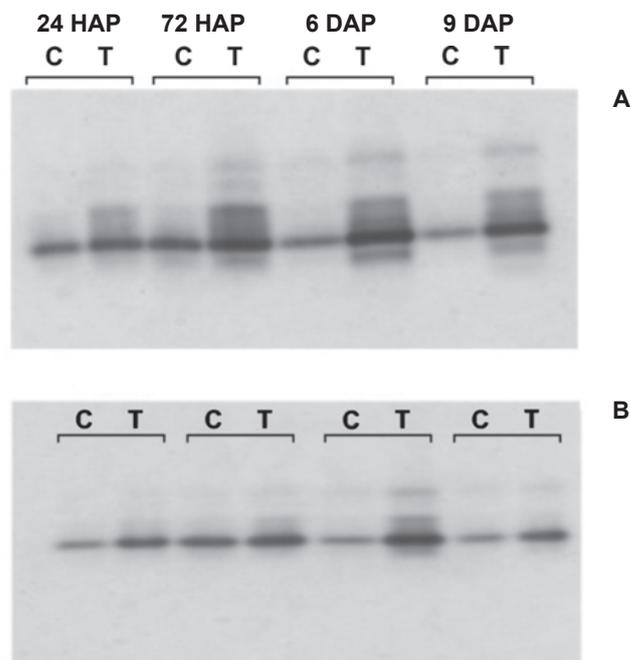


FIG. 5 - Eletroforese em gel de poliácridamida, em condições nativas, revelando isoformas de peroxidases (POX) em plantas de tomateiro pulverizadas com A. ASM (0,2 g L⁻¹) e B. Ecolife® (5 mL L⁻¹). Quantidade de proteína por poço: 15 µg. Avaliações realizadas 24, 72 hs após pulverização (HAP) e 6, 9 dias após pulverização (DAP). A cada avaliação, 'C' refere-se às plantas pulverizadas com água (controles) e 'T' refere-se às plantas pulverizadas com ASM e Ecolife® (tratadas).

após com Xv responderam com aumento não significativo no conteúdo de lignina aos 9 DAP, em comparação com plantas pulverizadas com água, e pulverizadas com água e inoculadas (Tabela 1). Como nem as plantas apenas pulverizadas com Ecolife®, nem as plantas pulverizadas com água, e inoculadas, diferiram significativamente ($P \leq 0,05$) do controle, é possível que exista efeito sinérgico envolvendo a pulverização com Ecolife® e inoculação com a bactéria sobre o acúmulo de lignina em folhas de plantas de tomate. Aos 12 DAP, observou-se aumento no conteúdo de lignina em todas as plantas estudadas, mantendo-se as mesmas tendências de resposta de 9 DAP, mas sem diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos. Em plantas pulverizadas com ASM e inoculadas observou-se uma tendência de acúmulo de lignina nas folhas, no entanto sem apresentar diferença significativa aos 9 e 12 DAP (Tabela 1). A análise do conteúdo de fenóis solúveis totais em folhas de plantas de tomateiro pulverizadas com Ecolife® e ASM, não inoculadas e inoculadas, mostrou redução generalizada, em comparação com plantas pulverizadas com água, inoculadas e não inoculadas, aos 9 e 12 DAP (Tabela 1).

Na tentativa de relacionar os dados de lignina e conteúdo de fenóis solúveis totais, a atividade de PAL foi medida em folhas das plantas estudadas aos 3, 6, 9 e 12 DAP. Em plantas pulverizadas com ASM e Ecolife® (Figuras 3C e 4C, -□-), a atividade de PAL em folhas foi significativamente ($P \leq 0,05$) maior em comparação com os respectivos controles, obedecendo a uma linha geral de decréscimo, com a particularidade de que em plantas tratadas com Ecolife® houve uma queda brusca 6 DAP (Figura 4C, -□-). De modo intrigante, plantas de tomateiro pulverizadas com ASM e Ecolife® (Figuras 3C e 4C, -■-) previamente à inoculação com Xv não apresentaram aumentos marcantes na atividade de PAL em folhas, ao longo do tempo de avaliação, com seus valores permanecendo no nível dos respectivos controles (Figuras 3C e 4C, -●-).

DISCUSSÃO

Como ASM (Bion®) é um indutor de resistência amplamente reconhecido, inclusive por sua ação sobre a infecção de *X. vesicatoria* em tomateiro (Silva, 2002), as plantas pulverizadas com este composto foram consideradas como referência para a proteção diante do patógeno desafiador, em relação a Ecolife®. A despeito das plantas tratadas com Ecolife® terem mostrado redução significativa nos índices de severidade da mancha bacteriana, houve um significativo atraso no desenvolvimento vegetativo das mesmas, quando comparadas às testemunhas sadias e plantas pulverizadas com ASM. A inibição no crescimento é freqüentemente associada à influência da deposição de lignina sobre a extensibilidade da parede celular primária, afetando a elongação celular (Boudet, 1998). Como, aos 9 DAP, a lignificação induzida em folhas de plantas tratadas com Ecolife® e inoculadas com *X. vesicatoria* aumentou significativamente, mantendo a mesma tendência a 12 DAP (Tabela 1), sugere-se que o aumento na lignificação possa ter influenciado negativamente o desenvolvimento do tomateiro. Unido a isto, podemos destacar também o radical aumento de atividade de POX em plantas tratadas com Ecolife® entre 8-24 HAP (Figura 2B), como indicação de dreno energético ou potencial para síntese de lignina.

Ecolife® inibiu o crescimento *in vitro* de Xv. Este efeito inibitório também pode ter contribuído para a proteção das plantas de tomate contra a mancha bacteriana. Por exemplo, o extrato metanólico de folhas de *Datura metel* mostrou tanto efeito antimicrobiano, quanto indução de resistência sistêmica em arroz desafiado por *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama 1922) Mew & Kersters (Kagale *et al.*, 2004). Foi sugerido que altas concentrações de polifenóis e moléculas correlatas observadas em Ecolife® induziram toxidez direta sobre colônias de Xv. Segundo o próprio fabricante, o Ecolife® é uma formulação natural, baseada em flavonóides, polifenóis

TABELA 1 - Efeito de Ecolife® (5ml l⁻¹) e ASM (0,2 g l⁻¹) sobre a deposição de lignina (derivados de ácido tioglicólico) e fenólicos solúveis totais, 9 e 12 DAP, em folhas de tomateiro, cv. Santa Cruz Kada

¹ Tratamento	Lignina ($\mu\text{g } 10^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$)		Fenóis totais ($\mu\text{g } 10^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$)	
	² Dias após pulverizações (DAP)			
	9	12	9	12
Água	2,60 ± 0,30b	3,75 ± 0,09a	0,85 ± 0,05ab	1,03 ± 0,12ab
Água + Xv	3,06 ± 0,74ab	4,01 ± 0,75a	0,95 ± 0,13a	1,23 ± 0,11a
Ecolife®	3,27 ± 0,32ab	3,96 ± 0,41a	0,60 ± 0,01bc	0,74 ± 0,12b
Ecolife® + Xv	3,83 ± 0,24a	4,48 ± 0,50a	0,49 ± 0,12c	0,81 ± 0,03b
ASM	3,43 ± 0,22ab	4,06 ± 0,11a	0,58 ± 0,01bc	0,79 ± 0,02b
ASM + Xv	3,39 ± 0,74ab	4,39 ± 0,11a	0,54 ± 0,07c	0,83 ± 0,06ab

¹Tratamentos foram pulverizados sobre as folhas 15 dias após a semeadura e plantas inoculadas foram pulverizadas com uma suspensão de *Xanthomonas vesicatoria* 4 dias após as aplicações de ASM e Ecolife®.

²Dentro de cada dia (colunas), valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

e fitoalexinas extraídos de biomassa cítrica.

Resistência induzida por ASM e Ecolife® em plantas de tomateiro contra Xv foi evidenciada quando ambas as substâncias foram pulverizadas quatro dias antes da inoculação. Este intervalo de tempo está equivalente àqueles relatados em trabalhos de indução de resistência (Silva, 2002; Sharathchandra *et al.*, 2004). A partir da pulverização de ASM e Ecolife® em plantas de tomateiro, foram observados aumentos nas atividades de enzimas relacionadas à defesa como POX e PPO, e deposição de lignina no tecido foliar. Apesar da atividade de PAL mostrar uma tendência de queda ao longo do período experimental, houve também uma indicação de indução de respostas desta enzima, principalmente em plantas pulverizadas com ASM.

Atividades maiores de PAL, POX e PPO, resultando em reforço da parede celular, têm sido associadas com indução de resistência local e sistêmica (Anterola & Lewis, 2002). POX tem sido associada com vários processos fisiológicos tais como, deposição de lignina e suberina em resposta a estresses abióticos e bióticos, como ataque de patógenos (Boudet, 1998). Em plantas, PPO tem sido associada também à lignificação, além de ser um fator na proteção de plantas injuriadas contra outros organismos invasores, pela ação tóxica de quinonas reativas produzidas a partir da catálise de compostos fenólicos (Mayer & Staples, 2002). PAL é uma enzima chave da rota dos fenilpropanóides, envolvida na produção de compostos secundários relacionadas à defesa de plantas, incluindo o ácido salicílico, fitoalexinas e monômeros de lignina (Thangavelu *et al.*, 2003). De fato, a redução no acúmulo de fenólicos das plantas tratadas pode ser devido ao desbalanço entre a produção e o consumo de intermediários fenólicos, contribuindo, por sua vez, para a queda de fenólicos totais (Tabela 1). Mais do que isto, maiores atividades de enzimas a jusante na via de fenilpropanóides, como sintases de chalcona (CHS), desidrogenases de álcool cinâmico e a própria POX poderia ter promovido um efeito de dreno sobre os substratos fenólicos solúveis. Como evidência, em banana desafiada com *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula e *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen, foi observada uma redução no conteúdo de fenólicos, após um aumento proeminente na atividade de POX e redução da atividade de PAL (Thangavelu *et al.*, 2003). Em pimentão inoculado com *Phytophthora capsici* Leonian (Gayoso *et al.*, 2004), apesar do aumento de compostos fenólicos nas folhas, foram relatados menores valores de compostos fenólicos totais em tecidos onde foram verificados picos de atividade de POX, em similaridade com dados relatados no presente trabalho. Naturalmente, mais investigações devem ser feitas para elucidar as causas da redução de fenóis totais nas plantas tratadas.

Em conclusão, ASM e Ecolife® são efetivos indutores de respostas de resistência em tomateiro desafiado pelo agente causador da mancha bacteriana, *X. vesicatoria*. A redução de severidade da doença está associada ao aumento da atividade de enzimas relacionadas à defesa

(principalmente POX e PPO) e a deposição de lignina em tecidos foliares.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DAHMANI, J.H., ABBASI, P.A., MILLER, S.A. & HOITINK, H.A.J. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. *Plant Disease* 87:913-919. 2003.
- ANTEROLA, A.M. & LEWIS, N.G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/ mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61:221-294. 2002.
- ARAÚJO, J.S.P., ROBBS, C.F. & RIBEIRO, R.L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. Parte 1. Revisão Anual de Patologia de Plantas 11:107-131. 2003.
- BOUDET, A.M. A new view of lignification. *Trends in Plant Science* 3:67-71. 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254. 1976.
- CAMPBELL, C. L. & MADDEN, L. V. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York. J. Wiley & Sons. 1990.
- GAUILLARD, F., RICHARD-FORGET, F. & NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Analytical Biochemistry* 215:59-65. 1993.
- GAYOSO, C., POMAR, F., MERINO, F. & BERNAL, M.A. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102:1-13. 2004.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14:177-193. 2003.
- HE, C.Y., HSIANG, T. & WOLYN, D.J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 51:225-230. 2002.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley CA. California Agricultural Experiment Station, University of California. 1950.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:96-97. 1970.
- KAGALE, S., MARIMUTHU, T., THAYUMANAVAN, B., NANDAKUMAR, R. & SAMIYAPPAN R. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

- Physiological and Molecular Plant Pathology 65:91–100. 2004.
- LI, J., ZINGEN-SELL, I. & BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by β -aminobutyric acid and methyl jasmonate. *Journal of Plant Disease Protection* 103:288-299. 1996.
- MALAMY, J., SANCHEZ-CASAS, P., HENNIG, J., GUO, A. & KLESSIG, D. Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9:474-482. 1996.
- MARINGONI, A.C., KUROZAWA, C., BARBOSA, V. & SILVA NETO, J.M. Controle químico da mancha bacteriana. *Summa Phytopatologica* 12:92-101. 1986.
- MAYER, A. M. & STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565. 2002.
- MONTIES, B. Lignins. In: Dey, P.M. & Harborne, J.B. (Eds.) *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 1. New York. Academic Press. 1989. pp. 113-158.
- MORI, T., SAKURAI, M. & SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Science* 160:355-360. 2001.
- OKUSHIMA, Y., KOIZUMI, N., KUSANO, T. & SANO H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 42:479-488. 2000.
- 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 acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51:621-628. 2002.
- RYALS, J.A., UKNES, S. & WARD, E. Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 104:1109-1112. 1994.
- SAMY, R.P., IGNACIMUTHU, S. & RAJA, D.P. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology* 66:235-240. 1999.
- SHARATHCHANDRA, R.G., NIRANJANRAJ, S., SHETTY, N.P., AMRUTHESH, K.N. & SHEKAR SHETTY, H. A Chitosan formulation Elexa induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection* 23:881–888. 2004.
- SIDHU, G.S. & WEBSTER, J.M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. *Physiological Plant Pathology* 11:117-127. 1977.
- SILVA, L.H.C.P. Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. (Dissertação de Mestrado). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2002.
- SPANOS, G.A. & WROLSTAD, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 38:1565-1571. 1990.
- THANGAVELU, R., PALANISWAMI, A., DORAISWAMY, S. & VELAZHAHAN R. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* on induction of defense enzymes and phenolics in banana. *Biologia Plantarum* 46:107-112. 2003.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: produces and some application. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 76:4350-4354. 1979.
- URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E. & HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologia Plantarum* 13:43-50. 1991.