

CAMILA CRISTINA LAGE DE ANDRADE

**SILÍCIO E INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA PINTA
BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA**

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2012**

CAMILA CRISTINA LAGE DE ANDRADE

**SILÍCIO E INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA PINTA
BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Orientadora: Professora Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano

Co-orientador: Professor Dr. José Rogério de Oliveira

Co-orientador: Professor Ph. D. Fabrício Ávila Rodrigues

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2012**

**SILÍCIO E INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA PINTA
BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA**

CAMILA CRISTINA LAGE DE ANDRADE

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 16/02/2012

ORIENTADORA

Prof^a Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

EXAMINADORES:

Prof. Ph. D. Fabrício Ávila Rodrigues
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Prof^a Dra. Elineide Barbosa de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dr. Adriano Márcio Freire Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

RECIFE-PE
FEVEREIRO-2012

Ficha catalográfica

A553s Andrade, Camila Cristina Lage de
Silício e indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa / Camila Cristina Lage de Andrade. -- Recife, 2012.
79 f. : il.

Orientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2012.

Referências.

1. Acibenzolar-S-metil 2. Ácido jasmônico 3. Ethephon
4. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 5. Silício solúvel
6. *Solanum lycopersicum* I. Mariano, Rosa de Lima Ramos, Orientadora II. Título

CDD 632

Aos meus amados pais Ronaldo e Maria da Conceição, minha irmã Bruna e Antonio pelo companheirismo, apoio e amor incondicional.

DEDICO

*“Se planejamos para um ano
Devemos plantar cereais...
Se planejamos para uma década,
Devemos plantar árvores...
Se planejamos pela vida inteira,
Devemos treinar e educar os homens...”*

KWANTSU

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo conforto espiritual e por estar sempre do meu lado nos momentos de incertezas e angústia.

A professora Rosa de Lima Ramos Mariano, pela orientação nos trabalhos, amizade e compartilhamento de conhecimentos.

Ao professor José Rogério de Oliveira pela co-orientação, pela amizade, confiança e por conceder o uso do Laboratório de Bacteriologia para a realização do meu trabalho na Universidade Federal de Viçosa.

Ao professor Fabrício Ávila Rodrigues pela amizade, dedicação, paciência, orientação e por conceder o uso do Laboratório Interação Patógeno-Hospedeiro para a realização do meu trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realização do Mestrado;

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização de toda a parte experimental da Dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais por sempre me incentivarem e abrirem mão de seus sonhos para a realização dos meus. A minha irmã Bruna por sempre estar ao meu lado e me dar força para sempre seguir em frente. Ao Antonio pelo companheirismo, amor, paciência e incentivo.

Aos eternos amigos e amigas Carol, Paula, Bruna, Patrícia, Lorena, Carina, Renatinha, Ivanete, Bruna, Susan e Kátia pela força, carinho e amizade nos momentos que mais precisei.

Aos amigos dos laboratórios de Bacteriologia e da Interação Patógeno-Hospedeiro, em especial ao Wiler, Jonas, Hέλvio, Daniel, Lívio e Gilcianny pelo carinho, amizade, paciência e por me auxiliarem na execução dos meus trabalhos. A Renata, pela amizade, paciência e auxílio na determinação das atividades enzimáticas.

As amigas de república e do Mestrado, Mayumi, Mellina, Sabrina, Conrado, Myrzânia, Antonio Neto e Christiano pela paciência, incentivo e amizade.

Ao Éder, Alberto e Henrique pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os colegas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco por me acolherem e contribuírem para a realização do meu trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal de Viçosa, em especial a Sueli e ao Bruno.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	VII
RESUMO GERAL	IX
GENERAL ABSTRACT	XI
CAPÍTULO I	13
INTRODUÇÃO GERAL	13
A CULTURA DO TOMATEIRO	14
A PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO	15
SILÍCIO NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS	16
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO II	29
SILÍCIO NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
OBTENÇÃO DO ISOLADO DE <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>TOMATO</i>	33
SOLO UTILIZADO PARA O CULTIVO DAS PLANTAS	34
FONTE, DOSES DE SI E ADUBAÇÃO DAS PLANTAS	35
AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DE RESISTÊNCIA	36
EFEITO DO SS NO CRESCIMENTO DA <i>PST IN VITRO</i>	36
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PEROXIDASES (POX, EC 1.11.1.7), POLIFENOLOXIDASES (PFO, EC 1.10.3.1), <i>B</i> -1,3-GLUCANASES (GLU, EC 3.2.1.39), FENILALANINA AMÔNIA-LIASES (FAL, EC 4.3.1.5) E LIPOXIGENASES (LOX, EC 1.13.11.12).....	36
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ALDEÍDO MALÔNICO (MDA).....	38
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
RESULTADOS	39
COMPONENTES DE RESISTÊNCIA	39
CONCENTRAÇÃO FOLIAR DE SI	39
EFEITO DO SS NO CRESCIMENTO <i>PST IN VITRO</i>	39
ATIVIDADE DAS ENZIMAS POX, PFO, GLU, FAL E LOX.....	39
CONCENTRAÇÃO DE MDA.....	40
DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO III	56
INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA	56
RESUMO	57
ABSTRACT	57

INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	60
OBTENÇÃO DO ISOLADO DE <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>TOMATO</i>	60
PLANTIO	60
PULVERIZAÇÃO DOS INDUTORES DE RESISTÊNCIA.....	61
AVALIAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO E DO NÚMERO DE LESÕES DA PINTA BACTERIANA POR PLANTA	61
EFEITO DO AJ E DO ET NO CRESCIMENTO DE <i>PST IN VITRO</i>	61
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PEROXIDASES (POX, EC 1.11.1.7), POLIFENOLOXIDASES (PFO, EC 1.10.3.1), <i>B</i> -1,3-GLUCANASES (GLU, EC 3.2.1.39) E LIPOXIGENASES (LOX, EC 1.13.11.12).....	61
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	63
RESULTADOS.....	63
PERÍODO DE INCUBAÇÃO E NÚMERO DE LESÕES DA PINTA BACTERIANA POR PLANTA	63
EFEITO DO AJ E ET NO CRESCIMENTO DE <i>PST IN VITRO</i>	64
ATIVIDADE DAS ENZIMAS POX, PFO, GLU E LOX.....	64
DISCUSSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CONCLUSÕES GERAIS	78
CONCLUSÕES GERAIS	79

RESUMO GERAL

A pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) (Okabe) Young, Dye & Wilkie tem importância econômica para a cultura do tomateiro industrial no Brasil. O uso de agentes potencializadores e/ou indutores das defesas das plantas é uma alternativa que atende aos requisitos do manejo integrado de doenças. Este estudo avaliou o efeito do silício (Si) e de indutores químicos em alguns componentes de resistência do tomateiro à pinta bacteriana e na atividade de enzimas envolvidas na defesa das plantas. No primeiro estudo plantas de tomateiro foram cultivadas em: solo sem silicato de cálcio (controle) (T1), solo sem silicato de cálcio e plantas pulverizadas com Supa Sílica[®] (SS) (2 mL/L de SS) (T2) e solo com silicato de cálcio (0,38 g) (T3), sendo inoculadas por pulverização com suspensão do patógeno. Foram avaliados o período de incubação (PI), número de lesões (NL) por planta, severidade estimada pelo software QUANT 1.0 (SEQ) e concentração foliar de Si, bem como a atividade das enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), β -1,3-glucanases (GLU), fenilalanina amônia-liases (FAL), lipoxigenases (LOX) e concentração de aldeído malônico (MDA). Também foi avaliado o efeito do SS no crescimento de *Pst in vitro*. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o PI e para a concentração foliar de Si. Não houve diferença significativa para o NL por planta e a SEQ entre o tratamento T3 e o controle. O tratamento T2 reduziu significativamente o NL 46,8 e 45,1% e a SEQ 61,5 e 56,2%, em relação ao controle e ao tratamento T3, respectivamente. Houve resposta linear negativa das doses de SS no crescimento da *Pst in vitro*. A atividade das POX, PFO e GLU foi significativamente maior nos tratamentos T2 e T3. A atividade das FAL e das LOX foi significativamente maior no T3. A concentração de MDA foi significativamente maior no tratamento T2 em relação ao controle, nas plantas não inoculadas com *Pst* e aos 7 dias após inoculação (d.a.i.); sendo significativamente menor aos 10 d.a.i. No segundo estudo, três experimentos foram realizados para avaliar o efeito dos indutores ácido jasmônico (AJ; 0,1 mM), ethephon (ET; 0,5 mM) e acibenzolar-S-metil (Bion[®], ASM; 300 mg/L) pulverizados 48 h antes da inoculação da *Pst*, avaliando-se o PI e o NL por planta, além da atividade das enzimas POX, PFO, GLU e LOX. Também foi avaliado o efeito do AJ e do ET no crescimento da *Pst in vitro*. Apenas no experimento 3 o PI aumentou significativamente em 1 dia nas plantas pulverizadas com ASM em relação ao controle. O NL por planta foi significativamente reduzido pelos tratamentos AJ, ET e ASM em relação ao controle para todos os experimentos, atingindo valores de 38,9, 45,3 e 68,1%, respectivamente, no experimento 2. O crescimento da *Pst in vitro* não foi

influenciado significativamente pelo AJ ou ET. Em determinadas épocas de avaliação, o AJ elevou significativamente a atividade das POX, PFO e GLU; ASM elevou a atividade das PFO, GLU e LOX e o ET elevou a atividade das GLU e LOX em relação ao controle. Os resultados desses estudos evidenciam que a pulverização com SS e com indutores AJ, ET e ASM afetaram alguns dos componentes de resistência do tomateiro à pinta bacteriana, além de potencializar as enzimas POX, PFO, GLU, FAL e LOX, relacionadas com a defesa das plantas em resposta à *Pst*.

Palavras-chave: acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico, ethephon, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, silício solúvel, *Solanum lycopersicum*

GENERAL ABSTRACT

The bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) (Okabe) Young, Dye & Wilkie has economic relevance to the tomato for industry in Brazil. The use of products that potentiate and/or induce plant defenses is an alternative that meets the requirements of integrated disease management. This study aimed to evaluate the effect of silicon (Si) and chemical inducers in some components of tomato resistance to bacterial speck and activity of enzymes involved in plant defense. In the first study, tomato plants were grown in: soil without calcium silicate (control) (T1), soil without calcium silicate and plants sprayed with Supa Silica[®] (SS) (2 mL/L SS) (T2) and soil with calcium silicate (0.38 g) (T3), being inoculated by spraying with a suspension of the pathogen. Our research evaluated the incubation period (IP), number of lesions (NL) per plant, severity estimated by the software QUANT 1.0 (SEQ) and leaf concentration of Si, as well as the activity of enzymes peroxidases (POX), polyphenoloxidases (PPO) β -1,3-glucanases (GLU), phenylalanine ammonia lyases (PAL), lipoxygenases (LOX) and concentration of malondialdehyde (MDA). It was assessed the effect of SS in the *Pst* growth *in vitro*. There was no significant difference between treatments for the IP and the foliar concentration of Si. No significant differences were found for the NL per plant and SEQ between T3 and control. T2 significantly reduced NL in 46.8 and 45.1% and SEQ in 61.5 and 56.2% when compared with control and T3, respectively. There was negative linear response of SS doses on the *Pst* growth *in vitro*. The activity of POX, PPO and GLU was significantly higher in T2 and T3. The activity of PAL and LOX was significantly higher in T3. The MDA concentration was significantly higher in T2 compared to control, in non-inoculated plants and at 7 days after inoculation (d.a.i.), being significantly lower at 10 d.a.i. In the second study, three experiments were conducted to evaluate the effect of jasmonic acid (JA; 0.1 mM), ethephon (ET, 0.5 mM) and acibenzolar-S-methyl (Bion[®], ASM; 300 mg/L) sprayed 48 h before inoculation with *Pst*, evaluating the IP and NL per plant, and the activity of enzymes POX, PPO, GLU and LOX. It was also assessed the effect of JA and ET in the growth of *Pst in vitro*. Only in experiment 3 incubation period increased significantly by one day in the plants sprayed with ASM compared with control. In all experiments, NL per plant was significantly reduced by JA, ET and ASM in relation to the control reaching values of 38.9, 45.3 and 68.1%, respectively, in experiment 2. The growth of *Pst in vitro* was not significantly influenced. In some evaluation times JA has significantly raised the activity of POX, PPO and GLU; ASM has elevated the activity of PPO, GLU and LOX, while ET only significantly raised the activity of GLU and

LOX compared to the control. The results of these studies suggest that spraying tomato plants with SS and the inducers JA, ET and ASM affected some components of tomato resistance to bacterial speck, and activated the enzymes POX, PPO, GLU, PAL and LOX, involved in defense responses of tomato plants to *Pst*.

Keywords: acibenzolar-S-methyl, jasmonic acid, ethephon, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, soluble silicon, *Solanum lycopersicum*

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

TÍTULO DO TRABALHO: SILÍCIO E INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família Solanaceae e é a olerícola mais cultivada em todo o mundo, sendo superada apenas pela batateira (CANÇADO JR et al., 2003). O tomateiro é uma planta perene, de porte arbustivo, sendo cultivada anualmente. A planta pode desenvolver-se de forma rasteira, semi-ereta ou ereta. O crescimento é limitado nas variedades de crescimento determinado e ilimitado nas de crescimento indeterminado, podendo chegar, nesse caso, a 10 m em um ano. É uma hortaliça de larga adaptação climática, sendo a temperatura ótima para a germinação das sementes situada na faixa de 15 a 25 °C (ALVARENGA, 2004).

Em 2009, a produção mundial de tomateiro de mesa e industrial totalizou 141,4 milhões de t em área cultivada de 4,98 milhões de ha, com produtividade média de 28,4 t/ha. O maior produtor foi a China, com 34,1 milhões de t em 1,5 milhões de ha. O Brasil ocupa o nono lugar no *ranking* da produção mundial, com 4,2 milhões de t produzidos em quase 66 mil ha, sendo a produtividade média equivalente a 64,7 t/há (IBGE, 2010a).

O cultivo do tomateiro estende-se por todos os estados brasileiros. No ano de 2009, o maior produtor nacional foi Goiás com 1.377.322 t, seguido por São Paulo com 647.793 t e Minas Gerais com 492.323 t, participações de 33,4, 16,0 e 11,4%, respectivamente, na produção nacional. Na região Nordeste, a Bahia ocupa o 1º lugar com 302.783 t, Pernambuco o 2º lugar com 135.508 t, sendo o município de Camocim de São Félix responsável pela produção de 29.500 t, Ceará ocupa o 3º lugar com 114.564 t, Paraíba o 4º lugar com 26.125 t e Rio Grande do Norte o 5º lugar com 7.062 t (IBGE, 2010b).

Segundo Lopes e Stripari (1998), são grandes os benefícios sócio-econômicos proporcionados pela cadeia agroindustrial do tomateiro no Brasil, entretanto, vários são os fatores que diminuem a produtividade da cultura, destacando-se dentre eles as doenças, que estão altamente relacionadas com o nível de resistência genética da cultivar e o tipo de manejo empregado.

O tomateiro é suscetível a mais de 200 doenças (AGRIOS, 2005; JONES et al., 1991; LOPES; SANTOS, 1994). Devido à alta vulnerabilidade da cultura às doenças e as pragas,

são grandes as quantidades de agroquímicos empregados para o controle (KUROZAWA; PAVAN, 1997; LOPES; SANTOS, 1994). Dentre os problemas oriundos do uso abusivo destes produtos pode-se citar a seleção de populações de patógenos resistentes ao princípio ativo, redução ou mesmo eliminação da microbiota benéfica, contaminação de aquíferos e o longo tempo de persistência e permanência de alguns desses compostos no solo e ou nos órgãos vegetais (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; ZAMBOLIM, 2001).

A pinta bacteriana do tomateiro

Dentre as bacterioses do tomateiro, destaca-se a pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young Dye & Wilkie. No Brasil, esta doença foi observada pela primeira vez em 1959, em plantios de tomateiro no estado de São Paulo (ROBBS, 1962), mas somente foi responsável por grandes prejuízos a partir de meados da década de 70 (MALAVOLTA; RODRIGUES NETO, 1991). A doença tornou-se importante nas principais regiões produtoras de tomateiro industrial, cultivado sob pivô central. Sob condições de temperatura entre 20 e 25 °C e alta umidade a bactéria pode causar perdas na produção de até 30% (SILVA; LOPES, 1995).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* Migula pertencem à família Pseudomonadaceae, têm forma de bastonete, são Gram negativas, possuem flagelos lofotríquios, são aeróbicas, podem ser isoladas ou cultivadas em meio de cultura King B, utilizado para diferenciação de bactérias do grupo das fluorescentes das não fluorescentes (MARIANO et al., 2005). Os sintomas da doença são observados nas folhas, as quais apresentam lesões necróticas, circulares ou irregulares e, na face inferior dos folíolos, apresentam cor pardo-escura a preta. As lesões são circundadas por um halo clorótico amarelo. Em mudas, a doença provoca queda de cotilédones e desfolha, além de retardar o crescimento vegetativo, enquanto que, em plantas em pleno florescimento causa danos na haste, pecíolo, folíolo, ráquis floral e queda das flores e frutos pequenos. Em frutos maiores, os sintomas são pontos necróticos que variam do tamanho da cabeça de um alfinete a alguns milímetros de diâmetro, levemente salientes e de cor pardo-escura a preta (LOPES; ÁVILA, 2005). Tais sintomas podem ser confundidos com os da mancha bacteriana; entretanto, a distinção dos sintomas ocorre nos frutos, nos quais, no caso da pinta bacteriana, as lesões atingem apenas cerca de 1 mm de diâmetro, sendo lisas, brilhantes e de cor preta (ALVARENGA, 2004).

A bactéria pode sobreviver nas sementes, em restos culturais, em plantas voluntárias e no solo. Esses meios de sobrevivência têm sido considerados como fontes de inóculo no

campo (BONN; GITAITIS; MacNEILL, 1985; CHAMBERS; MERRIMAN, 1975; JARDINE; STEPHENS; FULBRIGHT, 1988).

Temperaturas amenas (18 a 23 °C) e alta umidade relativa do ar favorecem a doença, ao passo que temperaturas muito altas e ou baixa umidade fazem com que populações de *P. syringae* pv. *tomato* permaneçam temporariamente na folhagem como epifíticas. Sob condições favoráveis, o processo infeccioso tem início, o qual é favorecido por chuvas e irrigações por aspersão, principalmente, quando acompanhadas de ventos. Locais sujeitos a orvalho são extremamente favoráveis ao progresso da doença, pois permitem maior período de molhamento foliar (ALVARENGA, 2004).

Para o controle da pinta bacteriana, recomenda-se o uso de variedades com resistência conferida pelo gene *Pto*, tais como a cultivar BRS Tospodoro (EMBRAPA, 2010; PILOWSKY; ZUTRA, 1986; STOCKINGER; WALLING, 1994) e evitar o plantio de mudas com sintomas da doença, principalmente, nos períodos mais propícios à sua ocorrência (SILVA et al., 2002).

Para o controle químico, estão atualmente registrados um produto a base de oxiclureto de cobre inorgânico e o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (Bion[®]) (MAPA, 2007). Em condições climáticas muito propícias à doença, fungicidas cúpricos muitas vezes não são eficientes, o que pode também estar relacionado à predominância de isolados resistentes na população bacteriana presente nos locais de cultivo (SILVA; LOPES, 1995).

Silício no controle de doenças de plantas

A agricultura sustentável enfrenta vários problemas, destacando-se o controle de doenças, pragas e plantas invasoras. A conscientização acerca dos problemas ambientais causados pelos agroquímicos e a busca pela redução de uso, têm levado a muitas pesquisas que visam à obtenção de tecnologias e produtos pouco tóxicos a natureza, vários deles já utilizados no passado de forma empírica para o manejo fitossanitário (SILVA et al., 2010).

O uso de agentes potencializadores e ou indutores das defesas da planta é uma alternativa que atende aos requisitos do manejo integrado de doenças devido, principalmente, ao menor impacto ambiental causado (WALTERS; FOUNTAINE, 2009). O silício (Si) vem ganhando destaque para o controle de algumas doenças em plantas, proporcionando também uma melhor qualidade das culturas (MITANI; MA; IWASHITA, 2005).

Epstein (1994) estudando a essencialidade do Si relatou que tomateiros não são considerados como plantas acumuladoras e responsivas a Si. Porém, em experimentos realizados por Miyake e Takahashi (1978), a omissão deste elemento para plantas de

tomateiro causou sintomas de deficiência que apareceram no estágio dos primeiros botões florais.

Vários são os relatos na literatura do efeito do Si no controle de doenças fúngicas na cultura do arroz e em hortaliças. O patossistema arroz-*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. é o modelo nos estudos envolvendo Si, no qual a intensidade da brusone foi significativamente reduzida com a aplicação deste elemento no solo (DATNOFF; DEREN; SNYDER, 1997; RODRIGUES et al., 2003). A literatura também registra o efeito do Si no controle de doenças fúngicas em dicotiledôneas, tais como oídio em meloeiro, roseira e tomateiro (*Podosphaera xanthii* (Castagne) Braun & Shishkoff; *Sphaeroteca pannosa* (Wallr.) Lev. e *Leveillula taurica* (Lev.) Arnand, respectivamente); e murcha-de-fusário em pepino (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.) (BELÁNGER et al., 1995; CHÉRIF et al., 1992; MIYAKE; TAKAHASHI, 1983; YANAR, YANAR; GEBOLOGLER, 2011).

O efeito do Si em doenças bacterianas e em patógenos de plantas não acumuladoras desse elemento é pouco conhecido, porém, Dannon e Wydra (2004) estudando o efeito desse elemento em solução nutritiva verificaram significativa redução dos sintomas da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. tanto em genótipos suscetíveis quanto em moderadamente resistentes. Estes mesmos autores observaram correlações negativas entre a concentração de Si na raiz e o número de bactérias na parte mediana do caule, sugerindo, portanto, uma possível indução de resistência. Diogo e Wydra (2007) observaram também por meio de técnicas histoquímicas que a redução dos sintomas da murcha bacteriana do tomateiro em cultivar moderadamente resistentes e supridas com Si ocorre devido a alterações na parede celular dos vasos do xilema.

Diversas alterações nas plantas podem ser observadas devido ao ataque de diferentes patógenos, com o objetivo de evitar a penetração e colonização do hospedeiro. Deste modo, as plantas utilizam de diferentes estratégias, entre as quais se destacam os mecanismos estruturais e bioquímicos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Após a planta sofrer algum tipo de estresse, ocorre à ativação de vários eventos, dentre os quais a síntese de metabólitos secundários microbianos, espécies reativas de oxigênio e ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) como β -1,3-glucanases, quitinases e fenilalanina amônia-liases (GLAZERBROOK; ROGERS; AUSUBEL, 1997; OLIVEIRA; DANTAS; GURGEL, 2004; VAN LOON, 1997). Ghareeb et al. (2011), estudando a murcha bacteriana do tomateiro verificaram a possibilidade do Si apresentar um papel ativo na potencialização e antecipação (*priming*) da expressão de genes que codificam enzimas em

plantas inoculadas com *R. solanacearum*, demonstrando o papel deste elemento em realizar essa defesa da planta em nível transcricional.

Indução de resistência

A indução de resistência em plantas contra fitopatógenos envolve a ativação dos mecanismos de defesa latentes. A defesa induzida envolve um sistema de alerta da planta hospedeira, que reconhece o contato estabelecido com o patógeno, seguido pela transdução de uma cascata de sinais e a expressão de genes relacionados à defesa (LAMB et al., 1989). A resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um determinado patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência através da utilização de agentes externos (indutores), sendo estes agentes bióticos ou abióticos (RESENDE et al., 2004). Dentre os agentes abióticos mais utilizados destacam-se o acibenzolar-S-metil e o ácido salicílico (BENATO, 2003; RESENDE et al., 2000), assim como o ácido jasmônico (OLIVEIRA et al., 2006) e o etileno (BOLLER, 1991).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é um produto utilizado como indutor químico que possibilita proteção às plantas contra uma ampla gama de patógenos, dentre eles fungos, vírus e bactérias (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; GÖRLACH et al., 1996). Vários estudos têm demonstrado o ASM como um dos mais promissores indutores de resistência vegetal. Sua molécula é um éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3) tiadiazole-7-carbótico (SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005), sendo estudado como indutor de resistência em várias espécies vegetais, afetadas tanto por patógenos fúngicos quanto bacterianos, como em tomateiro contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (BAYSAL; SOYLU; SOYLU, 2003), *P. syringae* pv. *tomato* (HERMAN; DAVIDSON; SMART, 2008; SCARPONI; BUONAURO; MARTINETTI, 2001), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Pammel) Dowson (CAVALCANTI et al., 2006a, 2006b), em melão contra *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (BUZI et al., 2004), em batata contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Van Hall) Hauben et al. (BENELLI; DENARDIN; FORCELINI, 2004) e em pimentão contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Pammel) Dowson (ROMEIRO; KOUSIK; RITCHIE, 2001).

O ácido salicílico, jasmonatos e etileno têm sido relatados como elementos envolvidos na transdução de sinais de eliciadores, convertendo sinais recebidos em respostas específicas celulares (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

O ácido jasmônico (AJ) e seus derivados encontram-se largamente distribuídos nos tecidos vegetais (BOSTOCK, 1999). De acordo com Sticher; Mauch-Mani e Metraux (1997), o AJ é produzido nas plantas após injúrias ou tratamentos com elicitores (KOZLOWSKI; BUCHALA; METRAUX, 1999), apresentando funções hormonais e de defesa contra fitopatógenos e insetos (STICHER; MAUCH-MANI; METRAUX, 1997). Inúmeros estudos evidenciam a importância do AJ na resposta de defesa das plantas contra fitopatógenos (BOSTOCK, 1999; MAUCH-MANI; METRAUX, 1998). Em tomateiros, aplicações exógenas de AJ ativam genes que codificam para a indução de algumas enzimas relacionadas à defesa, como peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO) e lipoxigenases (LOX) quando as plantas sofrem herbivoria (CIPOLLINI; REDMAN, 1999; STOUT et al., 1998; THALER, 1999).

As POX estão relacionadas com o processo de proteção antioxidativa, o qual catalisa a oxidação de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, além de promover o aumento na síntese de lignina que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos (KVARATSKHELIA; WINKEL; THORNELEY, 1997). As PFO catalisam a oxidação de *orto*-difenois formando *orto*-quinonas, as quais apresentam atividade antimicrobiana e também estão envolvidas na biossíntese da lignina (UMESHA, 2006). As LOX são dioxigenases que catalisam a adição de oxigênio molecular a moléculas de ácidos polinsaturados que apresentam o sistema *cis*, *cis*-1,4-pentadieno (HILDEBRAND, 1989), atuam nos ácidos graxos como o ácido linoléico, os quais representam os principais substratos em plantas superiores destas enzimas (AXEROLD; CHESSBOROUGH; LAAKSO, 1981; HILDEBRAND, 1989).

O etileno é um hormônio vegetal volátil de múltiplas funções fisiológicas nas plantas e é produzido pela invasão de patógenos e ativa respostas de defesa da através da produção de fitoalexinas (FAN; MATTHEIS, 2000). O tratamento com o produto ethephon (liberador de etileno) leva algumas plantas a expressarem genes que codificam a ativação de proteínas-PR (JACOBS; DRY; ROBINSON, 1999), indicando a possibilidade do etileno atuar na ativação da resistência. Dentre as proteínas-PR ativadas pelos indutores encontram-se as hidrolases β -1,3-glucanases (GLU), quitinases e as fenilalanina amônia-liases (FAL) que estão envolvidas no processo de lignificação da parede celular (GLAZERBROOK; ROGERS; AUSUBEL, 1997; OLIVEIRA; DANTAS; GURGEL, 2004; VAN LOON, 1997).

As GLU são responsáveis por degradar a parede celular de fungos, contribuindo para a geração de elicitores com potencial para ativar as respostas de defesas das plantas (MOHAMMADI; ROOHPARVAR; TORABI, 2002). As FAL catalisam a reação de

desaminação de *L*-fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico, a qual é a primeira etapa envolvida na rota dos fenilpropanóides que é de grande importância para a produção de compostos fenólicos, lignina com potencial antimicrobiano, além de algumas fitoalexinas (SCHUSTER; RETEY, 1995; TSUGE et al., 2004).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito do Si e de indutores químicos em alguns componentes de resistência do tomateiro à pinta bacteriana e na atividade de enzimas envolvidas na defesa das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th Ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.

ALVARENGA, M. A. R. **Cultura do tomateiro**. Lavras: UFLA, 2004. 392p.

AXEROLD, B; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, New York, v. 71, n. 4, p. 441-451, 1981.

BAYSAL, Ö.; 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* subsp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Berlin, v. 52, n. 6, p. 747-753, 2003.

BELÁNGER, R. R.; BOWEN, P. A.; EHRET, D. L.; MENZIES, J. G. Soluble silicon: Its role in crop and disease management of greenhouse crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, p. 329-335, 1995.

BENATO, A. R. A. Indução de resistência no controle de doenças em pós-colheita: frutas e hortaliças. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, p. 125-126, 2003.

BENELLI, A. I. H.; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 263-267, 2004.

- BOLLER, T. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: MATTOO, A. K.; SUTTLE, J. C. (Eds.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton ,CRC Press, pp. 293-314, 1991.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 13, p. 11-27.
- BONN, W.G.; GITAITIS, R.D.; MacNEILL, B.H. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato transplants shipped from Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 1, p. 58-60, 1985.
- BOSTOCK, R. M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 99-109, 1999.
- BUZI, A.; CHILOSE, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 152, n. 1, p. 34-42, 2004.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. 1^a ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.
- CANÇADO JR, F. L.; FILHO, C. W. P.; ESTANISLAU, M. L. L.; PAIVA, B. M.; MAZZEI, A. R.; ALVES, H. S. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate para mesa. **Informe Agropecuário**, Minas Gerais, v. 24, n. 219, p. 7-18, 2003.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B.; CARVALHO, C. P. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006a.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, J. P. M. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Activities of antioxidant and photosynthetic responses in tomato pre-

treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 1, p. 198-208, 2006b.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 13, p. 81-124.

CHAMBERS, S. C.; MERRIMAN, P. R. Penetration and control of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 26, n. 5, p. 657-663, 1975.

CHÉRIF, M.; BENHAMOU, N.; MENZIES, J. G.; BELÁNGER, R. R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 6, p. 411-425, 1992.

CIPOLLINI, D. F.; REDMAN, A. M. Age-dependent effects of jasmonic acid treatment and wind exposure on foliar oxidase activity and insect resistance in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 1, p. 271-281, 1999.

DANNON, E.; WYDRA, K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, n. 5, p. 233-243, 2004.

DATNOFF, L. E.; DEREN, C. W.; SNYDER, G. H. Silicon fertilization for diseases management of rice in Florida. **Crop Protection**, London, v. 16, n. 6, p. 525-531, 1997.

DIOGO, R. V. C.; WYDRA, K. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polisaccharide structure. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 70, n. 1, p. 120-129, 2007.

EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Hortaliças, 2010. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/cultivares>. Acesso em: 26 fev. 2012.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of the National Academy Science of United States America**, Washington, v. 91, n. 1, p. 11-17, 1994.

FAN, X. T.; MATTHEIS, J. P. Yellowing of broccoli in storage is reduced by 1-methylcyclopropene. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 5, p. 885-887, 2000.

GHAREEB, H.; BOZSÓ, Z.; OTT, P. G.; REPENNING, C.; STAHL, F.; WYDRA, K. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, n. 3, p. 83-89, 2011.

GLAZERBROOK, J.; ROGERS, E. E.; AUSUBEL, F. M. Use of *Arabidopsis* for genetics dissection of plant defense responses. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 547-569, 1997.

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

HERMAN, M. A. B.; DAVIDSON, J. K.; SMART, C. D. Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 11, p. 1226-1232, 2008.

HILDEBRAND, D. F. Lipoxygenases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 76, n. 1, p. 249-253, 1989.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**, 2010a. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatística/indicadores/agropecuária/>>. Acesso em: 26 fev. 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Lavoura temporária**, 2010b.

Disponível em: <<http://www.igbe.gov.br/home/estatística/economia/temas>>. Acesso em: 26 fev. 2012.

JACOBS, A. K.; DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethefon. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 48, n. 4, p. 325-336, 1999.

JARDINE, D. J.; STEPHENS, C. T.; FULBRIGHT, D. W. Potential sources of initial inoculum for bacterial speck in early planted tomato crops in Michigan: debris and volunteers from previous crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, n. 3, p. 246-249, 1988.

KOZLOWISKI, G.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. P. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 53-58, 1999.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3^a. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, cap. 64, p. 690-719.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R. N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 4, p. 1237-1245, 1997.

LAMB, C. J.; LAWTON, M. A.; DRON, M.; DIXON, R. A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Paris, v. 56, n. 56, p. 215-224, 1989.

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

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Embrapa Hortaliças, Brasília, 2005. 151p.

LOPES, M. C.; STRIPARI, P. C. A cultura do Tomateiro. In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. 1^a. ed. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1998. v. 1, cap. 9, p.257-319.

MALAVOLTA, V.J.; RODRIGUES NETO, J. Controle de doenças causadas por bactérias em tomateiro. In: Encontro Nacional de Produção e Abastecimento de Tomateiro, 2. 1991, Jaboticabal. **Anais...**Jaboticabal: FUNEP, p. 166-182, 1991.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Eds.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2^a. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 67-111.

MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 5, p. 535-540, 1998.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
AGROFIT – **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 26 fev. 2012.

MITANI, N.; MA, J. F.; IWASHITA, T. Identification of the silicon form in xylem SAP of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 2, p. 279-283, 2005.

MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon deficiency of tomato plant. **Soil Science and Plant Nutrition**, Japão, v. 24, n. 2, p. 175-189, 1978.

MIYAKE, Y.; TAKAHASHI E. Effects of silicon on the growth of cucumber plant in soil culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, Japão, v. 29, n. 1, p. 463-471, 1983.

MOHAMMADI, M.; ROOHPARVAR, R.; TORABI, M. Induced chitinase activity in resistant wheat leaves inoculated with an incompatible race of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of yellow rust disease. **Mycopathologia**, New York, v. 154, n. 3, p. 119-126, 2002.

OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; GURGEL, L. M. S. Indução de resistência em doenças pós-colheita em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 12, p. 343-371, 2004.

OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Eds). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 855p.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A. LILIAN (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3^a.Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap.22, p.417- 453.

PILOWSKY, M.; ZUTRA, D. Reaction of tomato genotypes to the bacterial speck pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 14, n. 1, p. 39-42, 1986.

RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; RESENDE, R. S.; BESERRA, JR, J. E. A.; SALGADO, S. M. L. Induction or resistance against *Phoma costaricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE. 2004. Elsinore. **Abstract Books...** Elsinore: Universitas Friburgensis, 2004. p. 79.

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

ROBBS, C. F. Relação de bactérias patogênicas em hortaliças observadas no Brasil. **Olericultura**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 140-145, 1962.

RODRIGUES, F.Á.; BENHAMOU, N.; DATNOFF, L. E.; JONES, J. B.; BELÁNGER, R. R. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 535-546, 2003.

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

SCARPONI, L.; BUONAURO, R.; MARTINETTI, L. Persistence and translocation of a benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Pest Management Science**, Alemanha, v. 57, n. 3, p. 262-268, 2001.

SCHUSTER, B.; RÉTEY, J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydrolanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, USA, v. 32, p. 8433-8437, 1995.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. L.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 586-593, 2002.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; JUNIOR, T. J. P.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas In: VENZON, M.; JÚNIOR, T. J. P., PALLINI FILHO, A.(coord.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**, Viçosa: EPAMIG, 2010, p. 33-54.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 179-183, 1995.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T.; CAVALCANTI, L. S. 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, 2005. p. 51-80.

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

STOCKINGER, E. J.; WALLING, L. L. Pto3 e Pto 4: novel genes from *Lycopersicon hirsutum* var. *glaberrimum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Theoretical and Applied Genetics, Berlim, v. 89, p. 879-994, 1994.

STOUT, M. J.; WORKMAN, K. V.; BOSTOCK, R. M.; DUFFEY, S. S. Stimulation and attenuation of induced resistance by elicitors and inhibitors of chemical induction in tomato (*Lycopersicon esculentum*) foliage. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Berlim, v. 86, n. 3, p. 267-279, 1998.

THALER, J. S. Induced resistance in agricultural crops: Effects of jasmonic acid on herbivory and yield of tomato plants. **Environmental Entomology**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 30-37, 1999.

TSUGE, S.; OCHIAI, H.; INOUE, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; KAKU, K.; KUBO, Y. Involvement of phosphoglucose isomerase in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 478-484, 2004.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Israel, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of plants Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997.

WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under Field conditions. **The Journal of Agricultural Science**, New York, v. 147, n. 5, p. 523-535, 2009.

YANAR, Y.; YANAR, D. GEBOLOGLU, N. Control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on tomato by foliar sprays of liquid potassium silicate. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 16, p. 3121-3123, 2011.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado – Fitossanidade**: cultivo protegido, pivô central e plantio direto. 1ª ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2001. 722p.

CAPÍTULO II

SILÍCIO NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA

1 **Silício no Controle da Pinta Bacteriana do Tomateiro e na Atividade de** 2 **Enzimas de Defesa**

3

4 CAMILA CRISTINA LAGE ANDRADE¹, RENATA SOUSA RESENDE², FABRÍCIO
5 ÁVILA RODRIGUES³, WILER RIBAS MOREIRA⁴, HÉLVIO GLEDSON MACIEL
6 FERRAZ⁵, JOSÉ ROGÉRIO OLIVEIRA⁶ e ROSA LIMA RAMOS MARIANO⁷

7

8 ^{1,4,7}UFRPE - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Av. Dom Manoel de Medeiros,
9 s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE; ^{2,3,5,6}UFV – Programa de Pós-Graduação em
10 Fitopatologia, Av. PH Rolfs, s/n - Campus Universitário, 36570-000 Viçosa-MG; Brasil,
11 kmila_lage@yahoo.com.br, rrbac@gmail.com.

12

13 **Resumo**

14 A pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) é importante nas
15 principais regiões produtoras de tomate industrial, cultivado sob pivô central no Brasil. Para
16 avaliar o efeito do silício (Si) sobre a doença, plantas de tomateiro cv. Santa Clara foram
17 cultivadas em: solo sem silicato de cálcio (controle) (T1), solo sem silicato de cálcio e plantas
18 pulverizadas com Supa Sílica[®] (2 mL/L de SS) (T2) e solo com silicato de cálcio (0,38 g)
19 (T3), sendo inoculadas por pulverização com suspensão do patógeno. Foram avaliados os
20 componentes de resistência, período de incubação (PI), número de lesões (NL) por planta,
21 severidade estimada pelo software QUANT 1.0 (SEQ) e concentração foliar de Si. Foi
22 avaliado o efeito do SS no crescimento da *Pst in vitro*. Foi quantificada a atividade das
23 enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), β -1,3-glucanases (GLU), fenilalanina
24 amônia-liases (FAL) e lipoxigenases (LOX), além da concentração de aldeído malônico
25 (MDA). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o PI e a concentração
26 foliar de Si. Não houve diferença significativa para o NL por planta e a SEQ entre o
27 tratamento T3 e o controle. O tratamento T2 reduziu significativamente o NL em 46,8 e
28 45,1% e a SEQ em 61,5 e 56,2% em relação ao controle e ao tratamento T3, respectivamente.
29 Houve resposta linear negativa das doses de SS no crescimento de *Pst in vitro*. A atividade
30 das POX, PFO e GLU foi significativamente maior nos tratamentos T2 e T3. A atividade das
31 FAL no tratamento T2 das plantas inoculadas com *Pst* não diferiu significativamente do
32 controle, exceto, por uma redução aos 2 dias após inoculação (d.a.i.). Já no tratamento T3, as
33 plantas apenas apresentaram maior atividade das FAL aos 5 d.a.i. A atividade das LOX foi
34 significativamente maior no tratamento T3 aos 2, 7 e 10 d.a.i., mas não foi alterada no

1 tratamento T2. A concentração de MDA foi significativamente maior no tratamento T2 em
2 relação ao controle nas plantas não inoculadas com *Pst* e aos 7 d.a.i.; sendo significativamente
3 menor aos 10 d.a.i. Não houve diferença significativa para esta concentração entre o controle
4 e o tratamento T3. Os resultados deste estudo sugerem que a pulverização com SS pode
5 reduzir os sintomas da pinta bacteriana em tomateiro, uma vez que, plantas dos tratamentos
6 T2 e T3 apresentaram maior atividade das enzimas POX, PFO, GLU, enquanto que, plantas
7 do tratamento T3 também apresentaram elevação da atividade das FAL e das LOX,
8 relacionadas à defesa das plantas à bactéria.

9 **Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*, silício solúvel, silicato de cálcio, *Pseudomonas*
10 *syringae* pv. *tomato*.

11

12 **Abstract**

13 The bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) is important in main
14 producing regions of tomato grown under central-pivot irrigation in Brazil. To evaluate the
15 effect of of silicon on this disease, tomato plants cv. Santa Clara were grown in: soil without
16 calcium silicate (control) (T1), soil without calcium silicate and plants sprayed with Supa
17 Sílica[®] (SS) (2 mL/L) (T2) and soil with calcium silicate (0, 38 g) (T3), being inoculated by
18 spraying with *Pst* suspension. Our study evaluated the components of resistance, incubation
19 period (IP), number of lesions (NL) per plant, severity estimated by the software QUANT 1.0
20 (SEQ) and concentration of Si in leaf. It was analyzed the effect of SS on *Pst* growth *in vitro*.
21 It was quantified the activity of the enzymes peroxidases (POX), polyphenoloxidases (PPO),
22 β -1,3-glucanases (GLU), phenylalanine ammonia lyases (PAL) and lipoxygenases (LOX),
23 and the concentration of malondialdehyde (MDA). There was no significant difference
24 between treatments for the IP and the foliar concentration of Si. No significant differences
25 were found for the NL per plant and SEQ between T3 and control. T2 significantly reduced
26 NL in 46.8 and 45.1% and SEQ in 61.5 and 56.2% when compared with control and T3,
27 respectively. There was negative linear response of SS doses on the *Pst* growth *in vitro*. The
28 activity of POX, PPO and GLU was significantly higher in T2 and T3. The activity of PAL in
29 inoculated plants of T2 was not significantly different from control, except, for a reduction to
30 2 days after inoculation (d.a.i.). However in T3, plants only showed increased activity of PAL
31 at 5 d.a.i. The LOX activity was significantly higher in T3 at 2, 7 and 10 d.a.i., but did not
32 change in T2. The MDA concentration was significantly higher in T2 compared to control,
33 only in non-inoculated plants and at 7 d.a.i., being significantly lower at 10 d.a.i. MDA
34 concentration did not significantly differ between control and T3. The results of this study

1 suggest that the SS spray can reduce the symptoms of bacterial speck in tomato, since T2 and
2 T3 plants showed higher activity of POX, PPO, GLU, and T3 plants also showed elevation of
3 PAL and LOX activity, all of them plant enzymes related to pathogen defense.

4 **Keywords:** *Solanum lycopersicum*, soluble silicon, calcium silicate, *Pseudomonas syringae*
5 *pv. tomato*.

6 (Recebido para publicação em; aceito em)

7

8 **Introdução**

9 Diversos fatores têm limitado a produtividade, o rendimento e o sucesso da produção do
10 tomateiro (Lopes e Quezado-Soares, 1997). As doenças estão entre os fatores mais
11 importantes, com destaque para a pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* *pv.*
12 *tomato*. A bactéria foi assinalada no Brasil em 1959, mas somente foi responsável por grandes
13 prejuízos a partir de meados da década de 70 (Malavolta e Rodrigues Neto, 1991). A doença
14 tornou-se importante nas principais regiões produtoras de tomateiro industrial, cultivado sob
15 pivô central. Sob condições de temperatura entre 20 e 25°C e alta umidade, a bactéria pode
16 causar perdas na produção de até 30% (Silva e Lopes, 1995).

17 Para o controle da pinta bacteriana, recomenda-se o uso de variedades com resistência
18 conferida pelo gene *Pto*, a exemplo da cultivar BRS Tospodoro (Pilowsky e Zutra, 1986;
19 Stockinger e Walling, 1994, Embrapa, 2010) e evitar o plantio de mudas com sintomas da
20 doença, principalmente, nos períodos mais propícios à sua ocorrência (Silva et al., 2002). Para
21 o controle químico estão atualmente registrados um produto a base de oxiclureto de cobre
22 inorgânico e um indutor de resistência, o acibenzolar-S-metil (Mapa, 2007). A eficiência dos
23 fungicidas cúpricos frequentemente não é observada em condições climáticas muito
24 favoráveis à pinta bacteriana, o que pode também estar relacionado à predominância de
25 isolados resistentes na população bacteriana presente na lavoura (Silva e Lopes, 1995).

26 A busca por formas de controle de doenças que apresentem redução do uso de
27 agroquímicos e a conscientização da população acerca dos problemas ambientais tem
28 contribuído para a realização de pesquisas, promovendo segurança alimentar, sustentabilidade
29 e, principalmente, o manejo fitossanitário (Silva et al., 2010b).

30 O uso de agentes potencializadores e ou indutores das defesas da planta é uma
31 alternativa que atende aos requisitos do manejo integrado de doenças devido, principalmente,
32 ao menor impacto ambiental causado (Walters e Fountaine, 2009). O silício (Si) vem
33 ganhando destaque para o controle de algumas doenças em plantas, proporcionando também
34 uma melhor qualidade das culturas (Mitani et al., 2005). Diversos são os relatos na literatura

1 do efeito do Si no controle de doenças fúngicas na cultura do arroz e em hortaliças. O
2 patossistema arroz-*Pyricularia grisea* é considerado o modelo, no qual a intensidade da
3 brusone foi significativamente reduzida com a aplicação de Si no solo (Datnoff et al., 1997;
4 Rodrigues et al., 2003a). Entretanto, o Si também tem sido estudado no controle de doenças
5 fúngicas em dicotiledôneas, tais como oídio (*Podosphaera xanthii*) em meloeiro, murcha-de-
6 fusário (*Fusarium solani*) em pepino, oídio (*Sphaeroteca pannosa*) em roseira e oídio
7 (*Leveillula taurica*) em tomateiro (Miyake e Takahashi, 1983, Chérif et al., 1992; Belánger et
8 al., 1995; Yanar et al., 2011).

9 O efeito do Si em doenças bacterianas e em patógenos de plantas não acumuladoras de
10 Si é pouco conhecido. No entanto, Dannon e Wydra (2004) verificaram que a murcha
11 bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em plantas de tomateiro tanto de genótipos resistentes
12 quanto moderadamente resistentes foi significativamente reduzida em plantas supridas com
13 Si. Segundo Diogo e Wydra (2007) essa redução nos sintomas da murcha bacteriana ocorreu
14 devido a alterações na estrutura da parede celular dos vasos do xilema, observadas por meio
15 de técnicas histoquímicas. Neste mesmo patossistema, Ghareeb et al. (2011) verificaram a
16 possibilidade do Si apresentar um papel ativo na potencialização e antecipação (*priming*) da
17 expressão de genes que codificam enzimas em plantas inoculadas com *R. solanacearum*,
18 demonstrando o papel deste elemento em realizar essa defesa da planta em nível
19 transcricional. Entretanto, Silva et al. (2010a) observaram que o período latente da estria
20 bacteriana (*Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*) em plantas de trigo supridas ou não com
21 Si foi o mesmo.

22 Diversas alterações nas plantas podem ser observadas devido ao ataque de diferentes
23 patógenos, dentre os quais a síntese de metabólitos secundários microbianos, espécies reativas
24 de oxigênio e ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-
25 PR) como β -1,3-glucanases e quitinases (Glazerbrook et al., 1997; Van Loon 1997; Oliveira
26 et al., 2004). No caso de doenças bacterianas foliares em tomateiro, não foi encontrado
27 nenhum relato na literatura do possível efeito do Si para o controle destas fitobacterioses.
28 Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da pulverização do Supa Sílica[®] e do
29 silicato de cálcio via solo, como fontes de Si, na resistência do tomateiro à pinta bacteriana e
30 os mecanismos bioquímicos potencializados pelo Si.

31

32 **Material e Métodos**

33 **Obtenção do isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***

34 O isolado de *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) foi obtido de plantas de tomateiro com sintomas de
35 pinta bacteriana em plantio no município de Coimbra, Minas Gerais, Brasil e preservado em

1 óleo mineral e água destilada esterilizada (Mariano e Assis, 2005). A identidade do isolado foi
 2 confirmada por teste de patogenicidade em tomateiro, testes LOPAT (Levana + Oxidase +
 3 Podridão em batata + Arginina + Hipersensibilidade em Tabaco) (Fahy e Persley, 1983;
 4 Schaad, 1988) e sequenciamento do gene 16S rRNA (Lane, 1991).
 5 Para utilização nos experimentos, o isolado *Pst* foi cultivado em meio Kado 523 (Kado e
 6 Heskett, 1970) (sacarose 10 g, caseína ácida hidrolisada 8 g, extrato de levedura 4 g, K_2HPO_4
 7 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g, ágar 15 g, água destilada 1000 mL) pelo método de estrias (Silveira e
 8 Mariano, 2005) por 24 horas a temperatura de 28 °C. Após este período, água de torneira foi
 9 adicionada a placa de Petri contendo o crescimento bacteriano e a concentração da suspensão
 10 foi ajustada em fotolorímetro (Analyser[®]) a 540 nm de absorvância (A_{540nm}), de acordo com
 11 equação pré-estabelecida onde: $A_{540} = 0,20$ equivale a $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

12 Solo utilizado para o cultivo das plantas

13 Foram utilizados os primeiros 20 cm de perfil de um solo pertencente à classe Latossolo
 14 Amarelo ácrico típico (Embrapa, 1999) de textura muito argilosa, coletado no município de
 15 Uberlândia, Minas Gerais. Essa classe de solo foi escolhida por apresentar baixo teor de
 16 silício (Si) disponível. A análise físico-química desse material de solo encontra-se nas Tabelas
 17 1 e 2.

18
 19 **Tabela 1.** Características físicas do material de solo do Latossolo Amarelo ácrico típico na
 20 camada de 0-20 cm.

Análise Granulométrica				
Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Classe Textural
-----g/kg-----				
140	59	84	717	Muito Argiloso

21

22

23

24 **Tabela 2.** Características químicas do material de solo de Latossolo Amarelo ácrico típico na
 25 camada de 0-20 cm.

Características Químicas													
pH	Si	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al ³⁺	SB	t	T	V	m	M.O.
KCl	mg/kg	mg.dm ⁻³	-----			cmol _c .dm ⁻³		-----			-----%	dag/kg	
4,3	8,6	1,1	8	0,3	0,1	0,1	4,2	0,22	0,52	4,42	5,0	58	1,9

1 **Fonte, doses de Si e adubação das plantas**

2 Como fonte de Si foi utilizado o produto comercial AgroSilício[®] (silicato de cálcio, CaSiO₃)
3 da Empresa Harsco Minerais, Timóteo, Minas Gerais. Este produto apresenta as seguintes
4 características químicas: poder relativo de neutralização total (PRNT) de 88%, teor total em
5 Si de 10,5%, teor total em Ca de 25% e teor total de Mg de 6%. Foram empregadas as doses
6 de 0 e 1,50 g de silicato de cálcio/kg de solo, correspondendo, respectivamente, a 0 e 0,38 g
7 Si/kg de solo (Tratamentos T1 - controle e T3). Objetivando equilibrar a concentração de Ca e
8 Mg presente em 1,50 g de silicato de cálcio/kg de solo, adicionou-se 0,96 g de CaCO₃ e 0,78
9 g de MgCO₃/kg de solo. Com este procedimento, as concentrações de Ca e Mg provenientes
10 do silicato de cálcio e do carbonato de cálcio ficaram padronizadas em 0,39 g Ca/kg de solo e
11 0,09 g de Mg/kg de solo, respectivamente. Apenas a concentração de Si variou entre esses
12 tratamentos. Em seguida, procedeu-se a incubação do solo em sacos plásticos por um período
13 de trinta dias com a umidade mantida constante. A adubação do solo antes da semeadura foi
14 feita aplicando-se 1,63 g de Ca₂(H₂PO₄)₂ por kg de solo. Sementes de tomateiro da cultivar
15 Santa Clara, cedidas pela empresa Sakata Seed Sudamerica (Bragança Paulista, São Paulo)
16 foram semeadas em número de seis sementes por vaso. Após a emergência, efetuou-se o
17 desbaste deixando-se apenas duas plantas por vaso. Quinze dias após a semeadura, foi
18 fornecida às plantas de tomateiro 50 mL de solução nutritiva por vaso, contendo, em mg L⁻¹,
19 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de MgSO₄.7H₂O, 61 de uréia, 0,27 de
20 NH₄MO₇O₂₄.4H₂O, 1,61 de H₃BO₃, 6,67 de ZnSO₄, 1,74 de CuSO₄.5H₂O e 4,10 de
21 MnCl₂.4H₂O, 4,08 de FeSO₄.7H₂O e 5,58 de EDTA bisódico. A solução também foi aplicada
22 na segunda e na terceira semana após a semeadura. As plantas foram mantidas em casa de
23 vegetação, onde a temperatura variou de 18 a 27 °C, sendo irrigadas diariamente. Aos 34 dias
24 após semeadura, plantas cultivadas em solo sem silicato de cálcio receberam pulverização do
25 produto Supa Sílica[®] (SS) (Agrichem, Ribeirão Preto; 23,7% K₂O + 10% Si, pH 9,42) na dose
26 de 2 mL/L (tratamento T2), 24 horas antes da inoculação com *Pst*. Cada planta foi pulverizada
27 com 25 mL de SS. Posteriormente, todas as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro
28 com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz, onde permaneceram por 24 horas
29 até a pulverização com uma suspensão bacteriana na concentração de 1,0 × 10⁸ UFC mL⁻¹,
30 com auxílio de um atomizador De Vilbs n^o 15. As plantas permaneceram na câmara de
31 nevoeiro durante 24 horas após a inoculação, quando foram transferidas para casa de
32 vegetação, onde a temperatura variou de 18 a 27 °C. As plantas foram irrigadas diariamente
33 enquanto duraram as avaliações.

1 **Avaliação dos componentes de resistência**

2 Em cada planta foram avaliados nos cinco folíolos das folhas 1 e 2 totalmente expandidas: o
3 período de incubação (PI), o número de lesões (NL) por planta e a severidade estimada pelo
4 software QUANT (SEQ). O PI (dias) foi obtido pela avaliação das folhas a cada 24 horas após
5 a inoculação (h.a.i.) e foi definido como o intervalo de tempo entre a inoculação e o
6 aparecimento de lesões necróticas com halo clorótico. O NL por planta foi avaliado aos 12
7 dias após inoculação (d.a.i.). Em seguida, estas folhas foram coletadas e suas respectivas
8 imagens escaneadas em resolução de 300 dpi. As imagens foram processadas para quantificar
9 a área lesionada, utilizando-se o software QUANT 1.0 (Liberato, 2003).

10

11 **Determinação da concentração foliar de Si**

12 Aos 12 d.a.i., todas as folhas inoculadas das plantas das repetições de cada um dos três
13 tratamentos foram coletadas. As folhas foram lavadas com água desionizada, secadas em
14 estufa com ventilação forçada de ar a 60 °C por 72 h e trituradas em moinho do tipo Willey
15 com peneira de 20 mesh. A concentração foliar de Si foi determinada de acordo com
16 Korndörfer et al. (2004).

17 **Efeito do SS no crescimento da *Pst in vitro***

18 *Pst* foi cultivada em meio Kado 523 líquido (sacarose 10 g, caseína ácida hidrolisada 8 g,
19 extrato de levedura 4 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄.7H₂O 0,3 g, água destilada 1000 mL) (Kado e
20 Heskett, 1970) por 24 horas a temperatura de 28 °C. Em poços de placas tipo ELISA, a cada
21 250 µL de crescimento bacteriano foram adicionadas as doses de 0; 0,125; 0,25, 0,5 e 1 µL de
22 SS. Como controle negativo, utilizou-se apenas meio de cultura. A concentração de 0,5
23 µL/250 µL de crescimento bacteriano correspondeu a concentração de 2 mL/L pulverizada
24 nas plantas de tomateiro. Após 24 horas, a absorvância em cada tratamento foi medida
25 utilizando espectrofotômetro a 580 nm.

26 **Determinação da atividade das enzimas peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC** 27 **1.10.3.1), β -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39), fenilalanina amônia-liases (FAL, EC 4.3.1.5) e** 28 **lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12)**

29 Amostras das folhas 1 e 2 das plantas de tomateiro das repetições de cada tratamento foram
30 coletadas aos 2, 5, 7 e 10 d.a.i. Amostras de folhas de plantas não inoculadas com *Pst*
31 serviram como controle (0 d.a.i.). As amostras foram armazenadas individualmente em papel
32 alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N₂) líquido e, em seguida, armazenadas em
33 ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

1 Para obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas POX,
2 PFO, GLU e FAL, amostras de 0,3 g de tecido foliar fresco foram maceradas com N₂ líquido
3 em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até obtenção de um pó fino.
4 O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5)
5 contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF). O homogeneizado foi
6 centrifugado a 20000 × g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante foi usado para as determinações
7 enzimáticas. A atividade das POX foi determinada pela oxidação do pirogalol de acordo com
8 a metodologia de Kar e Mishra (1976). Uma mistura de 950 µL de água destilada, 750 µL
9 tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 600 µL de pirogalol e 600 µL de peróxido de
10 hidrogênio 100 mM foi adicionada a 20 µL do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm
11 em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a cada 10 seg.
12 durante 1 min após adição do extrato à mistura totalizando cinco leituras. O coeficiente de
13 extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade das POX (Chance e
14 Maehley, 1955), a qual foi expressa em mM de purpurogalina produzida por min⁻¹ mg⁻¹ de
15 proteína. Durante todo o processo, os tubos de microcentrifuga foram cobertos com papel
16 alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz. A atividade das PFO foi determinada a
17 semelhança das POX, exceto que o peróxido de hidrogênio não foi usado na mistura.

18 A atividade das GLU foi determinada conforme descrito por Lever (1972). A reação foi
19 iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 230
20 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 250 µL do substrato laminarina (Sigma-
21 Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 4 mg mL⁻¹. A mistura da reação foi incubada
22 em banho-maria por 30 min a 45 °C. Após o período de incubação, determinou-se a
23 quantidade de açúcares redutores através da adição de 250 µL de ácido dinitrosalicílico a
24 mistura e, em seguida, da sua incubação em banho-maria por 15 min a 100 °C. A reação foi
25 interrompida pelo resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura de 30 °C.
26 Nas amostras controle, a mistura de reação foi igual, exceto que o extrato vegetal foi
27 adicionado após o aquecimento da mistura a 100 °C. A absorbância do produto liberado pelas
28 GLU foi medida a 540 nm e a atividade dessa enzima foi expressa em unidades de
29 absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

30 A reação das FAL foi iniciada após a adição de 0,5 mL do extrato a uma mistura
31 contendo 2 mL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 1 mL 100 mM de *L*-fenilalanina. A
32 mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30 °C durante 4 horas. Nas amostras
33 controle, o extrato foi substituído por 1 mL do tampão Tris-HCl. A reação foi finalizada pela
34 adição de 60 µL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi

1 medida em espectrofotômetro a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
2 (Zucker, 1965) foi usado para calcular a atividade das FAL, a qual foi expressa em $\mu\text{M min}^{-1}$
3 mg^{-1} de proteína.

4 Para obtenção do extrato para determinação enzimática das LOX, 0,2 g de tecido foliar
5 foi macerado com N_2 líquido em almofariz. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de
6 tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,8) contendo Triton-X 1% (v/v) e PVP 1%. O
7 homogeneizado foi centrifugado a $15000 \times g$ por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado
8 como extrato para determinação da atividade das LOX. A reação foi iniciada após adição de 7
9 μL do extrato à uma mistura contendo 790 μL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e 5
10 μL do substrato linoleato de sódio 10 mM. A atividade das LOX foi determinada conforme
11 metodologia descrita por Axelrod et al. (1981). A absorbância do produto liberado pela LOX
12 foi medida em espectrofotômetro a 234 nm. O coeficiente de extinção molar de 25000 M^{-1}
13 cm^{-1} foi usado para determinar a atividade das LOX, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$
14 de proteína.

15 A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o
16 método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

17 **Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA)**

18 Amostras de folhas das plantas de cada repetição e tratamento foram coletadas aos 2, 5, 7 e 10
19 d.a.i. Amostras de folhas de plantas não inoculadas com *Pst* serviram como controle (0 d.a.i.).
20 As amostras foram armazenadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas
21 em N_2 líquido e, em seguida, armazenadas em ultra freezer a -80 °C para posterior análise. A
22 quantificação da concentração de MDA foi realizada conforme descrito por Cakmak e Horst
23 (1991). As amostras foram pesadas e, em seguida, homogeneizadas em 2 mL de ácido
24 tricloroacético (TCA), 0,1% (p/v). O extrato bruto foi centrifugado a $10000 \times g$ por 15 min.
25 Uma alíquota de 250 μL do sobrenadante foi adicionada a um tubo de microcentrífuga
26 contendo 750 μL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em TCA 20% e, em seguida,
27 incubado por 120 min a 90 °C, sob agitação. A reação foi interrompida em gelo e logo após,
28 foi realizada centrifugação a $13000 \times g$ durante 4 min. O sobrenadante foi utilizado para a
29 quantificação da concentração de MDA, procedendo-se à leitura da absorbância das amostras
30 a 532 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A
31 concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lima
32 et al., 2002) e os valores foram expressos em $\mu\text{mol de MDA kg}^{-1}$ de matéria fresca (MF).

1 **Delineamento experimental e análises estatísticas**

2 Dois experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com três
3 tratamentos sendo plantas de tomateiro cultivadas em solo sem silicato de cálcio (controle)
4 (T1), plantas cultivadas em solo sem silicato de cálcio e pulverizadas com SS (T2) e plantas
5 cultivadas em solo com silicato de cálcio (T3). Foram utilizadas seis repetições para avaliação
6 do PI, NL por planta, SEQ e a concentração foliar de Si. Os dados do PI, NL, SEQ e da
7 concentração foliar de Si obtidos dos dois experimentos foram combinados após determinação
8 da homogeneidade de variância pelo teste de Cochran e Bartlett (Gomez e Gomez, 1994). Os
9 dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo
10 teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados do efeito do SS no crescimento de
11 *Pst in vitro* foram submetidos à regressão linear. Apenas um experimento foi realizado para as
12 avaliações bioquímicas. Os dados da atividade das enzimas POX, PFO, GLU, FAL e LOX
13 foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de
14 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software SAS (SAS
15 Institute, Inc., 1989, Cary, NC).

16

17 **Resultados**

18 **Componentes de resistência**

19 Com relação ao PI, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). O
20 tratamento T2 reduziu significativamente o NL em 46,8 e 45,1% e a SEQ em 61,5 e 56,2%,
21 respectivamente, em relação aos tratamentos controle e T3, os quais não diferiram entre si
22 (Tabela 1).

23

24 **Concentração foliar de Si**

25 Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a concentração de Si (Tabela 1).

26 **Efeito do SS no crescimento *Pst in vitro***

27 Houve resposta linear negativa das doses de SS no crescimento de *Pst* (Fig. 1).

28 **Atividade das enzimas POX, PFO, GLU, FAL e LOX**

29 Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a atividade das enzimas POX,
30 PFO, FAL e LOX nas plantas não inoculadas com *Pst* (Figs. 2a, b, d, e). A atividade das POX
31 nas plantas inoculadas com *Pst* foi significativamente maior nos tratamentos T2 e T3 em
32 relação ao controle aos 5, 7 e 10 d.a.i. (Fig. 2a). Não houve diferença significativa para a
33 atividade desta enzima nos tratamentos T2 e T3 aos 2 e 10 d.a.i. A atividade das POX foi

1 significativamente maior no tratamento T2 aos 5 d.a.i., enquanto que, maior atividade desta
2 enzima ocorreu no tratamento T3 aos 7 d.a.i. (Fig. 2a).

3 Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a atividade das PFO para as
4 plantas inoculadas com *Pst* aos 2 d.a.i. (Fig. 2b). A atividade das PFO foi significativamente
5 maior nos tratamentos T2 e T3, em relação ao controle aos 5, 7 e 10 d.a.i. (Fig. 2b), não
6 havendo diferença significativa entre estes dois tratamentos (Fig. 2b).

7 A atividade das GLU foi significativamente maior nos tratamentos T2 e T3, em relação ao
8 controle aos 5 e 10 d.a.i. (Fig. 2c). Esta atividade também foi significativamente elevada no
9 tratamento T2 das plantas não inoculadas com *Pst* e no tratamento T3 aos 2 d.a.i. (Fig. 2c).
10 Não houve diferença significativa entre os tratamentos T2 e T3, exceto, aos 5 d.a.i. (Fig. 2c).

11 A atividade das FAL não diferiu do controle, exceto, por uma redução aos 2 d.a.i. no
12 tratamento T2 e por uma elevação aos 5 d.a.i. no tratamento T3 (Fig. 2d). Nestas duas épocas,
13 esta atividade foi significativamente maior no tratamento T3 em relação ao tratamento T2
14 (Fig. 2d). Não houve diferença significativa para a atividade das FAL entre os tratamentos aos
15 7 e 10 d.a.i. (Fig. 2d).

16 A atividade das LOX foi significativamente maior que o controle no tratamento T3 aos 2, 7 e
17 10 d.a.i. (Fig. 2e), mas não foi alterada no tratamento T2. Aos 2 e 10 d.a.i., a atividade das
18 LOX foi significativamente maior no tratamento T3 em relação ao controle e o tratamento T2
19 (Fig. 2e). Não houve diferença significativa para a atividade das LOX entre os tratamentos
20 nas plantas inoculadas com *Pst* aos 5 d.a.i. (Fig. 2e).

21 **Concentração de MDA**

22 A concentração de MDA foi significativamente maior nas plantas do tratamento T2 em
23 relação ao controle, quando não inoculadas com *Pst* e aos 7 d.a.i.; sendo significativamente
24 menor aos 10 d.a.i. (Fig. 2f). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a
25 concentração de MDA nas plantas inoculadas com *Pst* aos 2 e 5 d.a.i. (Fig. 2f). Não houve
26 diferença significativa para esta concentração entre o controle e o tratamento T3 (Fig. 2f).

27 **Discussão**

28 Diversas doenças em culturas de grande importância econômica como arroz, trigo, cevada,
29 centeio, milho, morango pepino, soja, sorgo, uva e tomateiro têm sido controladas pelo
30 fornecimento de Si (Belánger et al., 2003; Dannon e Wydra, 2004; Datnoff et al., 2007;
31 Dallagnol et al., 2009; Resende et al., 2009).

1 Dos resultados apresentados neste estudo, surgem as primeiras evidências de que
2 alguns dos componentes de resistência do tomateiro à pinta bacteriana podem ser afetados
3 pela aplicação de Si.

4 O Si não é considerado um nutriente essencial, mas pode auxiliar as plantas na
5 resistência a diversos tipos de estresses, sejam eles de origem biótica ou abiótica (Epstein,
6 2009). As espécies vegetais variam em relação à capacidade de acumular Si (Epstein, 1999).
7 Em virtude da concentração de Si nos tecidos das plantas, estas podem ser classificadas em
8 acumuladoras de Si, intermediárias ou não acumuladoras, sendo estas as que apresentam
9 concentração foliar de Si menor do que 0,5 dag/kg de matéria seca (Takahashi et al., 1990). O
10 tomateiro é incluído neste grupo, o que foi confirmado no presente estudo, já que os
11 tratamentos T1, T2 e T3 apresentaram concentrações foliares de Si variando de 0,30 a 0,35
12 dag/kg de matéria seca.

13 Dentre os componentes de resistência avaliados, destaca-se o PI que pode ser afetado
14 pela aplicação de Si. Embora neste estudo o Si não tenha prolongado o PI nas plantas que
15 receberam os três tratamentos, resultados promissores utilizando o Si em outros patossistemas
16 tem sido encontrados. Diogo e Wydra (2007) e Dannon e Wydra (2004) estudaram a
17 influência do Si no tomateiro inoculado com *Ralstonia solanacearum* e verificaram atraso no
18 aparecimento dos sintomas de murcha em cultivares suscetível e moderadamente resistente na
19 presença do Si. Em arroz, o PI foi consideravelmente prolongado pela aplicação de Si no solo
20 em plantas inoculadas com *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani* (Seebold et al., 2001;
21 Rodrigues et al., 2003b). Em plantas de trigo inoculadas com *Bipolaris sorokiniana* a
22 aplicação de Si prolongou o PI nas cultivares BR 18 e BRS 208 em até 10 h (Domiciano et
23 al., 2010). Em algumas interações patógeno-hospedeiro, o PI é mais quantificado do que o
24 período latente, definido como período entre a inoculação e o aparecimento das estruturas
25 reprodutivas do patógeno (Parlevliet, 1979). Entretanto, Silva et al. (2010a) observaram que
26 tanto o PI quanto o período latente da estria bacteriana do trigo não foram afetados pela
27 aplicação de Si, o que foi igualmente encontrado no presente trabalho para o PI.

28 Os melhores resultados foram obtidos no tratamento T2, o qual foi eficiente em
29 reduzir o NL por planta e a SEQ. Aplicações foliares de silicato de potássio têm contribuído
30 para reduzir doenças a exemplo do oídio do tomateiro (*Leveillula taurica*), mancha angular do
31 feijoeiro (*Pseudocercospora griseola*) e ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) (Yanar et
32 al., 2011; Rodrigues et al., 2010; Pereira et al., 2009). Diante dos resultados encontrados neste
33 estudo, três hipóteses foram propostas: i) possível deposição do SS na superfície das folhas e
34 na base dos tricomas, ii) efeito do potencial osmótico gerado pela presença do SS, sobre as

1 folhas, podendo afetar a multiplicação da bactéria; iii) e ainda o possível efeito do pH do SS,
2 sugerido pela inibição do crescimento de *Pst in vitro*.

3 Um dos possíveis mecanismos envolvidos na resistência do hospedeiro mediado pelo
4 Si, especialmente, no patossistema arroz-*Pyricularia grisea* é atribuído à deposição deste
5 elemento abaixo da cutícula (Kim et al. 2002). De acordo com Kaufman et al. (1985), na
6 epiderme foliar a sílica é incorporada à matriz celular, principalmente, nas paredes exteriores
7 da epiderme abaxial e adaxial e, dentro do lúmen de algumas células e tricomas. Mariano e
8 McCarter (1991), utilizando microscopia eletrônica de varredura, observaram que *P. syringae*
9 pv. *tomato* sobrevive epifiticamente nas depressões entre as células epidermais, na base dos
10 tricomas, ao longo das nervuras e ao redor de estômatos de tomateiros; locais onde o patógeno
11 iniciará a colonização quando as condições se tornarem favoráveis à doença. Mansvelt e
12 Hattingh (1987) já haviam relatado que *P. syringae* pv. *syringae* multiplicava-se na superfície
13 de folhas de pereiras, particularmente nos tricomas e nas depressões da camada cuticular,
14 penetrando no tecido por aberturas encontradas nestes locais. Existem fortes evidências de
15 que o comportamento de bactérias na superfície de plantas depende muito da sua densidade,
16 por exemplo, a sobrevivência de *Pseudomonas syringae* a estresses de dessecação está
17 fortemente relacionada à sua densidade populacional (Wilson e Lindow, 1994). Dallagnol
18 (2011a) observou que ao se aplicar silicato de potássio nas folhas de meloeiro ocorreu
19 acúmulo do produto na superfície externa das folhas, formando, certamente, uma barreira
20 física pela sua deposição após a evaporação da água e químicas, como o aumento do pH e do
21 potencial osmótico. Isto também foi demonstrado nos patossistemas pepino-*Podosphaera*
22 *xanthii* e *Sphaerotheca fuliginea* (Liang et al., 2005; Reuveni et al., 1995). Da mesma forma,
23 Pereira et al. (2009) verificaram que a aplicação foliar de soluções de silicato de potássio com
24 pH 10,5 e 5,5 reduziram eficientemente a severidade da ferrugem da soja, principalmente,
25 quando em pH mais ácido. Dallagnol (2011a) verificou através de micro análise de raio-X a
26 deposição de Si nas folhas de meloeiro pulverizadas com silicato de potássio e observou que
27 nas folhas lavadas superficialmente a concentração de Si foi reduzida em comparação as
28 folhas não lavadas do mesmo tratamento, indicando que, o Si aplicado via foliar, acumulou-se
29 apenas na parte externa da folha. Esses resultados corroboram com o presente estudo no que
30 se refere à barreira física proporcionada pelo SS.

31 O crescimento da *Pst* foi afetado diretamente quando se utilizou o SS *in vitro*,
32 provavelmente, devido ao pH do produto. Na dose testada *in vitro* correspondente à utilizada
33 na planta, verificou-se que o pH do meio antes do crescimento da bactéria era de 9,2. Segundo
34 Oginsky e Umbreit (1959), o pH ótimo para o crescimento bacteriano está entre 6,5 a 7,5.

1 Portanto, esse alto pH pode ter afetado o desenvolvimento da *Pst*. Nascimento (2005) e
2 Cavalcanti et al. (2005) verificaram que *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Acidovorax*
3 *avenae* subsp. *citrulli* têm crescimento ótimo nos pHs 7,0 a 7,5 e 7,4, respectivamente.
4 Amaral et al. (2008) verificaram que doses crescentes de silicato de potássio afetaram o
5 crescimento de *Cercospora coffeicola in vitro*, constatando um efeito fungitóxico do produto.
6 Geralmente, indutores ou potencializadores da resistência da planta não atuam sobre o
7 patógeno, entretanto, em alguns casos, estes podem afetar o patógeno diretamente (Nojosa,
8 2003).

9 Além de o Si afetar os componentes de resistência, neste trabalho, surgem as primeiras
10 evidências de que a redução dos sintomas da pinta bacteriana do tomateiro na presença do Si
11 esteve também associada com alterações na atividade das enzimas POX, PFO, GLU, FAL e
12 LOX, as quais estão comumente relacionadas com a defesa das plantas ao ataque de
13 patógenos. O Si desempenha um papel importante na maximização das respostas de defesa do
14 trigo, pepino e arroz à patógenos foliares através da produção de compostos fenólicos e na
15 estimulação da biossíntese de lignina (Marschner, 1995; Liang et al., 2005; Datnoff et al.,
16 2007). Como foi comprovado, o tratamento T3 não foi eficiente em reduzir o NL por planta e
17 a SEQ da pinta bacteriana, embora tenha contribuído para aumentar a atividade das enzimas
18 de defesa do tomateiro à bactéria. Dallagnol et al. (2009) demonstraram que uma pequena
19 quantidade de Si absorvido é requerida para aumentar a resistência aos patógenos,
20 corroborando com os resultados deste estudo. Dentre as enzimas de defesa da planta, as POX
21 estão relacionadas com o processo de proteção antioxidativa, o qual catalisa a oxidação de
22 componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, além de promover o aumento na
23 síntese de lignina que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas
24 pelos patógenos (Kvaratskhelia et al., 1997). As PFO são enzimas de defesa que catalisam a
25 oxidação de *orto*-difenóis formando *orto*-quinonas, as quais apresentam atividade
26 antimicrobiana e também estão envolvidas na biossíntese da lignina (Umesha, 2006). No
27 presente estudo, houve maior atividade das POX e das PFO durante o processo infeccioso de
28 *Pst* nos tratamentos T2 e T3 em relação ao controle. Também Liang et al. (2005) verificaram
29 aumento na atividade das enzimas POX e PFO em plantas de pepino supridas com Si e
30 inoculadas com *Podosphaera xanthii*, enquanto Domiciano et al. (2010) observaram aumento
31 na atividade das POX em plantas de trigo da cultivar BRS 208 supridas com Si e inoculadas
32 com *Bipolaris sorokiniana*.

33 As GLU são responsáveis por degradar a parede celular de fungos, contribuindo para a
34 geração de elicitores com potencial para ativar as respostas de defesas das plantas

1 (Mohammadi et al., 2002). Curiosamente, os resultados encontrados neste estudo para a
2 atividade das GLU foi significativo durante todo o período avaliado nos tratamentos T2 e T3.
3 Neste estudo, apesar de o Si estar contribuindo para o aumento da atividade das GLU, a
4 função desta enzima hidrolítica na resistência de plantas à infecção por patógenos bacterianos
5 ainda é pouco conhecida (Cavalcanti et al., 2006).

6 As FAL são enzimas que catalisam a reação de desaminação de *L*-fenilalanina a ácido
7 *trans*-cinâmico, a qual é a primeira etapa envolvida na rota dos fenilpropanóides que é de
8 grande importância para a produção de compostos fenólicos, lignina com potencial
9 antimicrobiano, além de algumas fitoalexinas (Schuster e Rétey, 1995; Tsuge et al., 2004). No
10 presente estudo, no tratamento T2, a atividade das FAL também não foi alterada em relação
11 ao controle, exceto, aos 2 d.a.i. No entanto, no tratamento T3, observou-se elevação da
12 atividade das FAL em relação ao controle aos 5 d.a.i. Também Liang et al. (2005) observaram
13 aumento na atividade das FAL em folhas não inoculadas de plantas de pepino supridas com Si
14 em solução nutritiva e inoculadas com *P. xanthii*. Além disso, Kavitha e Umesha (2008)
15 relataram a participação das FAL nos mecanismos de resistência de plantas de tomateiro,
16 observando aumento de atividade após inoculação com *Xanthomonas campestris* pv.
17 *vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Estes autores estudando
18 genótipos de tomateiro com diferentes níveis de resistência a *C. michiganensis* subsp.
19 *michiganensis* observaram que a FAL atingiu atividade máxima às 21 h.a.i. nos genótipos
20 resistentes.

21 As LOX são dioxigenases que catalisam a adição de oxigênio molecular a moléculas
22 de ácidos poli-insaturados que apresentam o sistema cis, cis-1,4-pentadieno (Hildebrand,
23 1989). As LOX atuam nos ácidos graxos como o ácido linoléico, os quais representam os
24 principais substratos em plantas superiores destas enzimas (Axelrod et al., 1981; Hildebrand,
25 1989). Pouco se conhece na literatura sobre o efeito do Si na atividade das LOX. Porém, neste
26 estudo, maior atividade das LOX no início e no final do processo infeccioso de *Pst* nas
27 plantas do tratamento T3 foram importantes para o aumento da resistência do tomateiro. Koch
28 et al. (1992) relataram diferentes formas de indução das LOX em tomateiros. De acordo com
29 os autores, as plantas foram inoculadas com *P. syringae* pv. *syringae* que induzia resposta de
30 hipersensibilidade e *Pst* que causava a pinta bacteriana, sendo que a atividade das LOX foi
31 elevada tanto na interação incompatível como na compatível. A diferença ocorreu na rapidez
32 da resposta. Na interação incompatível, o aumento na atividade das LOX ocorreu já nas
33 primeiras 24 h enquanto na interação compatível, este aumento ocorreu depois das 24 h.
34 Slusarenko et al. (1991) observaram que plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudomonas*

1 *syringae* pv. *phaseolicola* apresentaram aumento na atividade das LOX e que provavelmente
2 esta enzima estaria envolvida nos danos nas membranas celulares em reações de
3 incompatibilidade nas células afetadas. Durante um processo de estresse ocorrem danos
4 físicos às membranas celulares e, em virtude disso, uma degradação sequencial de lipídeos
5 pode ser iniciada pelas LOX. Estas formam hidroperóxidos, que são então clivados pela
6 hidroperóxido liase, formando aldeídos (Gardner, 1991; Zhuang et al., 1992; Silva et al.,
7 2001). Logo, alta atividade das LOX pode estar relacionada a danos físicos na membrana
8 celular. Diante disso, as plantas foram analisadas quanto à concentração de MDA, o qual é um
9 aldeído indicador de danos às membranas celulares, induzidos por qualquer tipo de estresse
10 (Fu e Huang, 2001; Jalloul et al., 2002). Foi verificado que houve aumento na atividade das
11 LOX no início e no final do processo infeccioso de *Pst* nas plantas do tratamento T3 e na
12 concentração de MDA nas plantas do tratamento T2 não inoculadas com *Pst* e aos 7 d.a.i.
13 Porém aos 10 d.a.i., houve redução na concentração de MDA no tratamento T2 em relação ao
14 controle. Esta redução indicou menor peroxidação lipídica, o que implica em maior
15 integridade e funcionalidade das membranas celulares considerada como efeito amenizante do
16 estresse oxidativo mediado pelo Si (Liang, 1999; Gunes et al., 2007a, 2007b). Dallagnol et al.
17 (2011b) também observaram que plantas de arroz da cultivar Oochikara, inoculadas com
18 *Bipolaris oryzae*, apresentaram maior concentração de MDA quando não supridas com Si.

19 Os resultados deste estudo sugerem que a pulverização de SS reduziu os sintomas da
20 pinta bacteriana em tomateiro através da formação de uma barreira física, na qual o elemento
21 é depositado na superfície da cutícula, ou através de efeitos osmóticos da aplicação do
22 produto, ou ainda, pelo efeito do pH do SS que atuou diretamente no crescimento da bactéria.
23 Além disso, há fortes evidências de que nos tratamentos T2 e T3 houve aumento da atividade
24 das enzimas POX, PFO e GLU, enquanto que, plantas do tratamento T3 apresentaram
25 também elevação da atividade das FAL e das LOX, relacionadas à defesa das plantas à *P.*
26 *syringae* pv. *tomato*.

27 Referências

- 28 Amaral DR, Resende MLV, Ribeiro Júnior PM, Borel JC, MacLeod REO, Pádua MA. (2008)
29 Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. *Fitopatologia*
30 *Brasileira* **33**:425-431.
- 31 Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S. (1981) Lipoxygenases from soybeans. *Methods in*
32 *Enzymology* **71**:441-451.
- 33 Belanger RR, Bowen PA, Ehret DL, Menzies JG. (1995) Soluble silicon: Its role in crop &
34 disease management of greenhouse crops. *Plant Disease* **70**:329-335.

- 1 Belánger RR, Benhamou N, Menzies JG. (2003) Cytological evidence of an active role of
2 silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*).
3 *Phytopathology* **93**:402–412.
- 4 Bradford MN. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
5 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*
6 **72**:248-254.
- 7 Cakmak I, Horst WJ. (1991) Effect of aluminum on lipid-peroxidation, superoxide-dismutase,
8 catalase and peroxidase-activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia*
9 *Plantarum* **83**:463-468.
- 10 Cavalcanti FR, Resende MLV, Pereira RB, Costa JCB, Carvalho CPS. (2006) Atividades de
11 quitinases e beta-1,3-glucanases após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha
12 bacteriana. *Fitopatologia Brasileira* **41**:1721-1730.
- 13 Cavalcanti MT, Silveira EB, Mariano RLR, Viana IO. (2005) Crescimento de *Acidovorax*
14 *avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentração de cloreto de sódio e
15 fontes de carbono. *Ciência Rural* **35**:1313-1318.
- 16 Chance B, Maehley AC. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*
17 **2**:764-775.
- 18 Chérif M, Benhamou N, Menzies JG, Belánger, RR. (1992) Silicon induced resistance in
19 cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*
20 **41**:411-425.
- 21 Dallagnol LJ. (2011a) *Epidemiologia e bioquímica do controle do oídio do meloeiro por*
22 *silício*. Piracicaba, São Paulo, Brasil, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
23 Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado.
- 24 Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MV, Pereira SC.(2011b) Deficiency in
25 silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-
26 *Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology* **101**:92-104.
- 27 Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE. (2009) Defective active silicon
28 uptake affects some components of rice resistance to brown spot. *Phytopathology* **99**:116-
29 121.
- 30 Dannon E, Wydra K. (2004) Interaction between silicon amendment, bacterial wilt
31 development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes.
32 *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**:233-243.
- 33 Datnoff LE, Deren CW, Snyder GH. (1997) Silicon fertilization for diseases management of
34 rice in Florida. *Crop Protection* **16**:525-531.

- 1 Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebold KW. (2007) In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM.
2 (Eds) *Mineral Nutrition and Plant Disease*, MN, USA, APS Press, pp 233-246.
- 3 Diogo RVC, Wydra K. (2007) Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia*
4 *solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polisaccharide structure.
5 *Physiological and Molecular Plant Pathology* **70**:120-129.
- 6 Domiciano GP, Rodrigues FA, Vale FXR, Xavier MSF, Moreira WR, Andrade CCL, Pereira
7 SC. (2010) Wheat resistance to spot blotch potentiated by silicon. *Journal of*
8 *Phytopathology* **158**:334-343.
- 9 Embrapa-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (1999) *Sistema brasileiro de*
10 *classificação de solos*, 1ª ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 412p.
- 11 Embrapa-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Embrapa Hortaliças*, 2010.
12 Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/cultivares>. Acesso em: 26 fev. 2012.
- 13 Epstein E. (1999) Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*
14 **50**:641-664.
- 15 Epstein E. (2009) Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology* **155**:155-
16 160.
- 17 Fahy PC, Perseley GJ. (1983) *Plant Bacterial Diseases—A Diagnostic Guide*. Sidney,
18 Academic Press, 393p.
- 19 Fu J, Huang B. (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of
20 two cool- season grasses to localized drought stress. *Environmental Experimental Botany*
21 **45**:105-114.
- 22 Gardner HW. (1991) Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants.
23 *Biochemical Biophysica Acta* **1084**:221-239.
- 24 Ghareeb H, Bozsó Z, Ott PG, Repenning C, Stahl F, Wydra K. (2011) Transcriptome of
25 silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-acumulator
26 tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **75**:83-89.
- 27 Glazerbrook J, Rogers EE, Ausubel FM. (1997) Use of *Arabidopsis* for genetics dissection
28 of plant defense responses. *Annual Review of Genetics* **31**:547-569.
- 29 Gomez KA, Gomez AA. (1994) *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd Ed.
30 New York, USA, Wiley.
- 31 Gunes A, Inal A, Bagci EG, Pilbeam, DJ. (2007a) Silicon-mediated changes of some
32 physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and
33 tomato grown in sodic-B toxic soil. *Plant and Soil* **290**:103-114.

- 1 Gunes A, Inal A, Bagci EG, Coban S, Sahnin O. (2007b) Silicon increases boron tolerance
2 and reduces oxidative damage of wheat grown in soil with excess boron, *Biologia*
3 *Plantarum* **51**:571-574.
- 4 Hildebrand DF. (1989) Lipoxygenases. *Plant Physiology* **76**:249-253.
- 5 Jalloul A, Montillet JL, Assgbetse K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylides C, Daniel JF,
6 Marmey P, Geiger JP, Nicole M. (2002) Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas*
7 interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *The Plant*
8 *Journal* **32**:1-12.
- 9 Kado CI, Heskett MG. (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
10 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**:969-976.
- 11 Kar M, Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice
12 leaf senescence. *Plant Physiology*. **57**:315-319.
- 13 Kaufman PB, Dayanandan P, Franklim CI, Takeoka Y. (1985) Structure and function of silica
14 bodies in the epidermal system of Grass shoots. *Annals of Botany* **55**:487-507.
- 15 Kavitha R, Umesha S. (2008) Regulation of Defense-Related Enzymes Associated with
16 Bacterial Spot Resistance in Tomato. *Phytoparasitica* **36**:144-159.
- 17 Kim SG, Kim KW, Park EW, Choi D. (2002) Silicon-induced cell wall fortification of Rice
18 leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*
19 **92**:1095-1103.
- 20 Koch E, Meier BM, Eiben HG, Slusarenko AA. (1992) Lipoxygenase from leaves of tomato
21 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic Pseudomonads.
22 *Plant Physiology* **99**:571-576.
- 23 Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A. (2004) *Análise de Silício, Solo Planta e Fertilizante*.
24 Uberlândia MG, Brazil. Boletim Técnico, Universidade Federal de Uberlândia. 24 pp.
- 25 Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF. (1997) Purification and characterization of a
26 novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology* **114**:1237-1245.
- 27 Lane DJ. (1991) 16S/23 rRNA sequencing. In: *Nucleid acid techniques in bacterial*
28 *systematic*. Stackebrandt E, Goodfellow M (eds), Sons JW, New York, NY, pp. 115-175.
- 29 Lever M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical*
30 *Biochemistry* **47**:273-279.
- 31 Liang YC. (1999) Effects of silicon on enzyme activity, and sodium, potassium and calcium
32 concentration in barley under salt stress. *Plant and Soil* **209**:217-224.

- 1 Liang YC, Sun WC, Si J, Romheld V. (2005) Effects of foliar and root applied silicon on the
2 enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant*
3 *Pathology* **54**:678-685.
- 4 Liberato JR. (2003) *Desenvolvimento e avaliação do software QUANT para quantificação de*
5 *doenças de plantas por análises de imagens*. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, Universidade
6 Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.
- 7 Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HÁ, Totola MR, Loureiro ME. (2002) Photochemical
8 responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit
9 conditions. *Environmental and Experimental Botany* **47**:239-247.
- 10 Lopes CA, Quezado-Soares AM. (1997) *Doenças Bacterianas das Hortaliças: diagnose e*
11 *controle*, Brasília: Embrapa Hortaliças. 70p.
- 12 Malavolta VJ, Rodrigues Neto J. (1991) Controle de doenças causadas por bactérias em
13 tomateiro. In: Encontro Nacional de Produção e Abastecimento de Tomateiro, 2. 1991,
14 Jaboticabal. *Anais...*Jaboticabal: FUNEP, p. 166-182.
- 15 Mansvelt EL, Hattingh MJ. (1987) Scanning electron microscopy of colonization of pear
16 leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Canadian Journal of Botany* **65**:2517-2522.
- 17 Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit – Sistemas de
18 Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso
19 em: 26 fev. 2012.
- 20 Mariano RLR, Assis SMP. (2005) Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano
21 RLR, Silveira EB. (Eds.). *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. 2^a ed. Recife, PE,
22 Brasil, Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 35-45.
- 23 Mariano RLR, McMarter SM. (1991) Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
24 on tomato and weeds. *Fitopatologia Brasileira* **16**:86-91.
- 25 Marschner H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Ed. London, UK: Academic
26 Press, 889 pp.
- 27 Mitani N, Ma JF, Iwashita T. (2005) Identification of the silicon form in xylem SAP of rice
28 (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* **46**:279-283.
- 29 Miyake Y, Takahashi E. (1983) Effects of silicon on the growth of cucumber plant in soil
30 culture. *Soil Science and Plant Nutrition* **29**:463-471.
- 31 Mohammadi M, Roohparvar R, Torabi M. (2002) Induced chitinase activity in resistant wheat
32 leaves inoculated with an incompatible race of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal
33 agent of yellow rust disease. *Mycopathologia* **154**:119-126.

- 1 Nascimento ARP. (2005) *Cancro bacteriano (Xanthomonas campestris pv. viticola) da*
2 *videira (Vitis spp.): métodos de preservação, crescimento de isolados, escala diagramática*
3 *e reação de variedades de videira à doença*. Recife, Pernambuco, Brasil, Universidade
4 Federal Rural de Pernambuco. Tese de Doutorado.
- 5 Nojosa GBA. (2003) *Efeito de indutores na resistência de Coffea arábica L. a Hemileia*
6 *vastatrix Berk e Br e Phoma costarricensis Echandi*. Universidade Federal de Lavras,
7 Lavras, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado.
- 8 Oginsky EL, Umbreit WW. (1959) *An Introduction to Bacterial Physiology*. 2nd Ed. San
9 Francisco: WH Freeman and Company, 443p.
- 10 Oliveira SMA, Dantas SAF, Gurgel LMS. (2004) Indução de resistência em doenças pós-
11 colheita em frutas e hortaliças. *Revisão Anual de patologia de plantas* **12**:343-371.
- 12 Parlevliet JE. (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development.
13 *Annual Review of Phytopathology* **17**:203-222.
- 14 Pereira SC, Rodrigues FÁ, Missio VC, Oliveira MG, Zambolim L. (2009) Aplicação foliar de
15 silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. *Tropical*
16 *Plant Pathology* **34**:164-179.
- 17 Pilowsky M, Zutra D. (1986) Reaction of tomato genotypes to the bacterial speck pathogen
18 (*Pseudomonas syringae pv. tomato*). *Phytoparasitica* **14**:39-42.
- 19 Resende RR, Rodrigues FA, Soares JM, Casela CR. (2009) Influence of silicon on some
20 components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines.
21 *European Journal of Plant Pathology* **124**:533-541.
- 22 Reuveni M, Agapov V, Reuvenir R. (1995) Suppression of cucumber powdery mildew
23 (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. *Plant*
24 *Pathology* **44**:31-39.
- 25 Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belánger RR. (2003a) Ultrastructural and
26 cytochemical aspects of silicon mediated rice blast resistance. *Phytopathology* **93**:535-546.
- 27 Rodrigues FA, Vale FXR, Korndörfer GH, Seebold KW, Rush MC. (2003b) Effect of silicon
28 and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease* **85**:827-832.
- 29 Rodrigues FA, Duarte HSS, Rezende DC, Wordell F, Korndörfer GH, Zambolim L. (2010)
30 Foliar spray of potassium silicate on the control of angular leaf spot on beans. *Journal of*
31 *Plant Nutrition* **33**:2082-2093.
- 32 Schuster B, Rétey J. (1995) The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the
33 role of prosthetic dehydrolanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
34 *USA* **32**:8433-8437.

- 1 Seedbold KW, Kuchareku TA, Datnoff LE, Correa-Victoria FJ, Marchetti MA. (2001) The
2 influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant
3 and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* **91**:63-69.
- 4 Schaad NW. (1988) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 2nd ed.,
5 Saint Paul, MN. APS Press. 158p.
- 6 Silva IT, Rodrigues FA, Oliveira JR, Pereira SC, Andrade CCL, Silveira PR, Conceição MM.
7 (2010a) Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. *Journal of*
8 *Phytopathology* **158**:253-262.
- 9 Silva MAS, Carmo MGF, Olivares FL, Pereira AJ. (2002) Termoterapia via calor seco no
10 tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris*
11 pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. *Fitopatologia Brasileira* **27**: 586-593.
- 12 Silva MB, Morandi MAB, Junior TJP, Venzon M, Fonseca MCM. (2010b) Extratos de
13 plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas In: Venzon M, Júnior TJP, Pallini
14 Filho A. (coord.). *Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica*,
15 Viçosa, MG, Brasil, EPAMIG, p. 33-54.
- 16 Silva MD, Oliveira MGA, Lanna AC, Pires CV, Piovesan ND, José IC, Batista RB, Barros
17 EG, Moreira MA. (2001) Caracterização da via da lipoxigenase em plantas de soja
18 resistentes e suscetíveis a *Diaphorte phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causal do
19 cancro da haste. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **13**:316-328.
- 20 Silva VL, Lopes CA. (1995) Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em
21 cultivo comercial de tomateiro industrial. *Fitopatologia Brasileira* **20**:179-183.
- 22 Silveira EB, Mariano RLR. (2005) Isolamento de bactérias fitopatogênicas In: Mariano RLR,
23 Silveira EB. *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. Recife, PE, Brasil, Universidade
24 Federal Rural de Pernambuco, p. 23-33.
- 25 Slusarenko AJ, Croft KPC, Voisey CR. (1991) Biochemical and molecular events in the
26 hypersensitive response of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. In: Smith CJ,
27 Ed, *Biochemistry and Molecular Biology of Host-Pathogen Interactions*. Clarendon Press,
28 Oxford, UK, p. 126-143.
- 29 Stockinger EJ, Walling LL. (1994) Pto3 e Pto 4: novel genes from *Lycopersicon hirsutum* var.
30 *glabratum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Theoretical and*
31 *Applied Genetics* **89**:879-994.
- 32 Takahashi E, Ma JF, Miyake Y. (1990) The possibility of silicon as an essential element for
33 higher plants. *Comments on Agricultural and Food Chemistry* **2**:99-122.

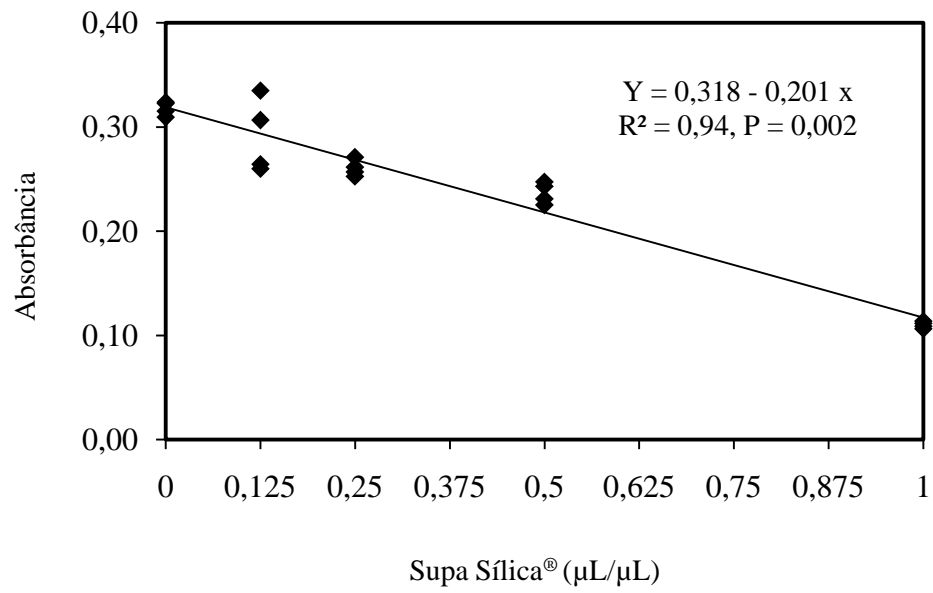
- 1 Tsuge S, Ochiai H, Inoue Y, Ohu T, Tsuno K, Kaku K, Kubo Y. (2004) Involvement of
2 phosphoglucose isomerase in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.
3 *Phytopathology* **94**:478-484.
- 4 Umesha S. (2006) Phenylalanine Ammonia Lyase activity in tomato seedlings and its
5 relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica* **34**:68-71.
- 6 Van Loon LC. (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related
7 proteins. *European Journal of plants Pathology* **103**:753-765.
- 8 Walters DR, Fountaine JM. (2009) Practical application of induced resistance to plant diseases:
9 an appraisal of effectiveness under field conditions. *The Journal of Agricultural Science*
10 **147**:523-535.
- 11 Wilson M, Lindow SE. (1994) Inoculum density-dependent mortality and colonization of the
12 phyllosphere by *Pseudomonas syringae*. *Applied Environmental Microbiology* **60**:2232-
13 2237.
- 14 Yanar Y, Yanar D, Gebologlu N. (2011) Control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on
15 tomato by foliar sprays of liquid potassium silicate. *African Journal of Biotechnology*
16 **10**:3121-3123.
- 17 Zhuang H, Hamilton-Kemp TR, Andersen RA, Hildebrand DF. (1992) Development change
18 in C₆-aldehyde formation by soybean leaves. *Plant Physiology* **100**:80-87.
- 19 Zucher M. (1965) Induction of phenylalanina deaminase by light and its relation to
20 chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* **40**:779-784.
21
22

1 **Tabela 1.** Período de incubação (PI), número de lesões (NL) por planta, severidade estimada
 2 pelo software QUANT (SEQ) e concentração foliar de silício (Si) em plantas de tomateiro
 3 cultivadas em: solo sem silicato de cálcio (T1), solo sem silicato de cálcio e pulverizadas com
 4 Supa Sílica[®] (SS) (T2) e solo com silicato de cálcio (T3); e inoculadas com *Pseudomonas*
 5 *syringae* pv. *tomato*

Tratamentos	PI (dias)	NL por planta	SEQ (%)	Si (dag/kg)
T1	4,60	222,35 b	1,92 b	0,34
T2	4,47	118,24 a	0,74 a	0,35
T3	4,15	215,42 b	1,69 b	0,30
Valor de F	0,93 ^{ns}	22,83 ^{**}	65,35 ^{**}	0,78 ^{ns}
C. V. (%)	19,30	22,77	18,10	28,10

7 Dados de dois experimentos. C.V. = coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna,
 8 não diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo teste Tukey. ^{ns} = não significativo. $n = 12$.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33



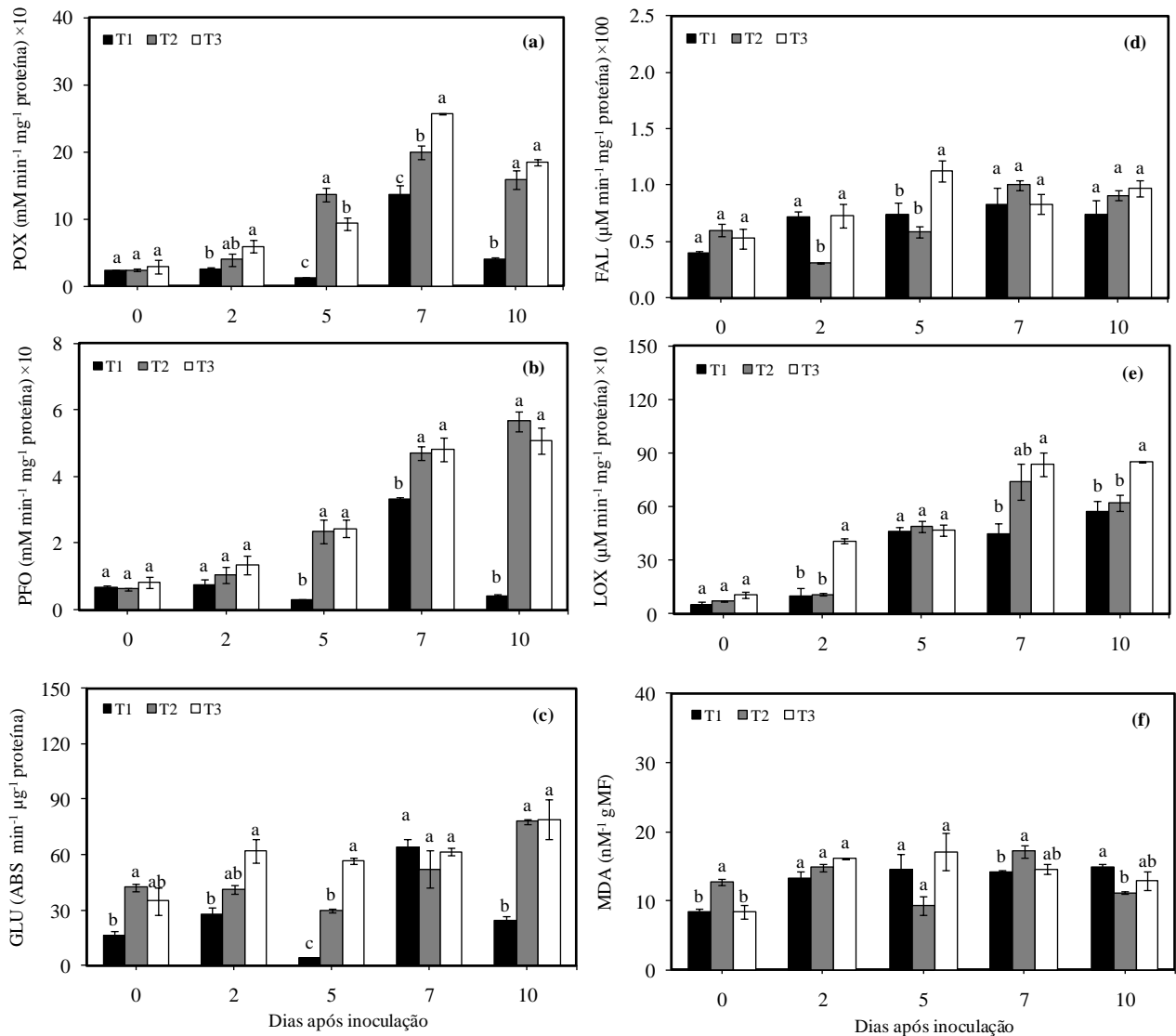
1

2 **Figura 1.** Efeito de doses de Supa Sílica® no crescimento de *Pseudomonas syringae* pv.
3 *tomato in vitro*.

4

5

1



2 **Figura 2.** Atividade de peroxidases (POX) (a), polifenoloxidasas (PFO) (b), β -1,3-glucanases
 3 (GLU) (c), fenilalanina amônia-liases (FAL) (d), lipoxigenases (LOX) (e) e concentração de
 4 aldeído malônico (MDA) (f) em folhas de tomateiro cultivadas em: solo sem silicato de cálcio
 5 (T1), solo sem silicato de cálcio e plantas pulverizadas com Supa Sílica[®] (T2) e solo com
 6 silicato de cálcio (T3); e inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Médias seguidas
 7 pela mesma letra para cada época de coleta não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de
 8 probabilidade.

9

CAPÍTULO III

INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE DEFESA

1 Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na 2 atividade de enzimas de defesa

3

4 Camila C. L. Andrade¹, Renata S. Resende², Fabrício Á. Rodrigues³, Patrícia R. Silveira⁴,
5 Jonas A. Rios⁵, José R. Oliveira⁶ e Rosa L. R. Mariano⁷

6

7 ^{1,7}Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900,
8 Recife, PE; Brasil; ^{2,3,4,5,6}Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa,
9 36570-000, Viçosa, MG; Brasil

10

11 Autor para correspondência: Camila C. L. Andrade, e-mail: kmila_lage@yahoo.com.br

12

13 RESUMO

14 Em três experimentos foi avaliado o efeito de pulverizações do ácido jasmônico (AJ),
15 ethephon (ET) e acibenzolar-S-metil (Bion[®]) (ASM) a 0,1 mM, 0,5 mM e 300 mg/L,
16 respectivamente, nos componentes de resistência de tomateiros cv. Santa Clara à pinta
17 bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) e na atividade de peroxidases
18 (POX), polifenoloxidasas (PFO), β -1,3-glucanases (GLU) e lipoxigenases (LOX). Foi
19 avaliado o efeito do AJ e do ET no crescimento da *Pst in vitro*. Apenas no experimento 3 o
20 período de incubação aumentou significativamente em 1 dia nas plantas pulverizadas com
21 ASM comparado ao controle. O número de lesões por planta foi significativamente reduzido
22 por AJ, ET e ASM nos três experimentos, atingindo valores de 38,9, 45,3 e 68,1%,
23 respectivamente, no experimento 2. O crescimento da *Pst in vitro* não foi influenciado
24 significativamente. Em determinadas épocas de avaliação, AJ elevou significativamente a
25 atividade das POX, PFO e GLU; ASM elevou a atividade das PFO, GLU e LOX; enquanto
26 ET elevou a atividade das GLU e LOX comparado ao controle. Conclui-se que AJ, ET e ASM
27 afetaram os componentes de resistência do tomateiro e ativaram as enzimas POX, PFO, GLU
28 e LOX, envolvidas nas respostas de defesa a *Pst*.

29 **Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*, ácido jasmônico, etileno, acibenzolar-S-metil,
30 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

31

32 ABSTRACT

33 **Inducing resistance in the control of bacterial speck of tomato and activity of defense**
34 **enzymes**

35 Three experiments were performed to evaluate the effect of spraying jasmonic acid (JA),
36 ethephon (ET), and acibenzolar-S-methyl (Bion[®]) (ASM) at 0.1 mM, 0.5 mM and 300 mg/L,
37 respectively, on the resistance components of tomato plants cv. Santa Clara to bacterial speck
38 caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), and on the activity of enzymes involved in
39 plant defense. It was also assessed the effect of JA and ET on *Pst* growth *in vitro*. Only in
40 experiment 3 incubation period increased significantly by one day in the plants sprayed with
41 ASM compared with control. In all experiments, number of lesions per plant was significantly
42 reduced by JA, ET e ASM in relation to the control reaching values of 38.9, 45.3 and 68.1%,
43 respectively, in experiment 2. The growth of *Pst in vitro* was not significantly influenced. In
44 some evaluation times JA has significantly raised the activity of peroxidases (POX),
45 polyphenoloxidases (PFO) and β -1,3-glucanases (GLU), ASM has elevated the activity of
46 PFO, GLU and lipoxygenases (LOX), while ET only significantly raised the activity of GLU
47 and LOX. In conclusion the application of inducers JA, ET and ASM affected the components
48 of tomato resistance and activated enzymes POX, PFO, GLU and LOX, involved in defense
49 responses of tomato plants to *Pst*.

50 **Keywords:** *Solanum lycopersicum*, jasmonic acid, ethephon, acibenzolar-S-methyl,
51 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

52

53 (Recebido para publicação em; aceito em)

54

55 INTRODUÇÃO

56

57 A pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* é uma doença
58 economicamente importante para a cultura do tomateiro. Sob condições de temperatura entre
59 20 e 25 °C e alta umidade, a doença pode causar perdas na produção de até 30% (Silva e
60 Lopes, 1995).

61 Para o controle da pinta bacteriana, recomenda-se o plantio de variedades com
62 resistência conferida pelo gene *Pto*, a exemplo da cultivar BRS Tospodoro (Pilowsky e Zutra,
63 1986; Stockinger e Walling, 1994, Embrapa, 2010) e evitar o plantio de mudas com sintomas
64 da doença, principalmente, nos períodos mais propícios à sua ocorrência (Silva et al., 2002).
65 O controle de doenças bacterianas é limitado quanto à disponibilidade de produtos químicos
66 (Silva et al., 2008). No Brasil, estão atualmente registrados um produto a base de oxiclreto
67 de cobre e o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (Bion[®]) (Mapa, 2007).

68 A busca por formas de controle de doenças que apresentem redução do uso de
69 agroquímicos e a conscientização da população acerca dos problemas ambientais vêm se
70 destacando e promovendo segurança alimentar, sustentabilidade e, principalmente, o manejo
71 fitossanitário (Silva et al., 2010).

72 A resistência induzida consiste no aumento do nível da resistência por meio da
73 utilização de agentes externos (indutores), sem qualquer alteração do genoma da planta, sendo
74 estes agentes bióticos e abióticos (Resende et al., 2004). O uso de produtos comerciais que
75 induzem resistência vem ganhando relevância no controle de doenças de plantas. Dentre eles
76 destaca-se o acibenzolar-S-metil (ASM), conhecido comercialmente como Bion[®], que atua
77 em várias espécies vegetais contra uma ampla gama de patógenos, dentre eles fungos, vírus e
78 bactérias (Görlach et al., 1996; Bonaldo et al., 2005). Este indutor de resistência possibilita
79 proteção em tomateiros contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Baysal et al,
80 2003), *P. syringae* pv. *tomato* (Scarponi et al., 2001; Herman et al., 2008) e *Xanthomonas*
81 *campestris* pv. *vesicatoria* (Cavalcanti et al., 2006a, 2006b); em melão contra *Didymella*
82 *bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Buzi et al., 2004); em batata contra *Pectobacterium*
83 *carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Benelli et al., 2004) e em pimentão contra *X. axonopodis*
84 pv. *vesicatoria* (Romeiro et al., 2001).

85 Diversos mecanismos podem ser ativados durante o fenômeno de indução de
86 resistência, dentre os quais a síntese de metabólitos secundários microbianos, espécies
87 reativas de oxigênio e ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese
88 (proteínas-PR) como β -1,3-glucanases e quitinases (Glazerbrook et al., 1997; Van Loon,
89 1997; Oliveira et al., 2004; Cavalcanti et al., 2005). O ácido salicílico (AS), jasmonatos e
90 etileno têm sido relatados como elementos envolvidos na transdução de sinais oriundos de
91 elicitores em respostas específicas dentro das células (Cavalcanti et al., 2005). O ASM é um
92 análogo ao AS, que induz a ativação de genes que codificam proteínas-PR e enzimas
93 relacionadas à produção de fitoalexinas e lignina (Cole, 1999; Resende et al., 2000). O ácido
94 jasmônico (AJ) e seus derivados (jasmonatos) estão relacionados a mecanismos de defesa
95 vegetal (Bostock, 1999; Mauch-Mani e Métraux, 1998; Cortês, 2000). Em tomateiros,
96 aplicações exógenas de AJ ativam genes que codificam para a indução de algumas enzimas
97 relacionadas à defesa da planta como peroxidases, polifenoloxidasas e lipoxigenases, quando
98 as plantas sofrem herbivoria (Stout et al., 1998; Cipollini e Redman, 1999; Thaler, 1999). O
99 etileno é um hormônio vegetal volátil de múltiplas funções fisiológicas nas plantas; é
100 produzido pela invasão de patógenos e pode ativar respostas de defesa da planta como a
101 produção de fitoalexinas (Fan e Mattheis, 2000).

102 Para o patossistema tomateiro-*P. syringae* pv. *tomato* existem poucos trabalhos
103 evidenciando o efeito dos indutores de resistência em reduzir os sintomas da pinta bacteriana,
104 bem como na atividade de enzimas envolvidas com a resistência da planta. Diante disso, o
105 objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de pulverizações dos indutores ácido jasmônico,
106 ethephon e acibenzolar-S-metil (Bion[®]) em alguns componentes de resistência do tomateiro à
107 pinta bacteriana e na atividade de enzimas envolvidas com a defesa da planta.

108

109

MATERIAL E MÉTODOS

110

111 **Obtenção do isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***

112 O isolado de *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) foi obtido de plantas de tomateiro com
113 sintomas de pinta bacteriana em plantio no município de Coimbra, Minas Gerais, Brasil e
114 preservado em óleo mineral e água destilada esterilizada (Mariano e Assis, 2005). A
115 identidade do isolado foi confirmada por teste de patogenicidade em tomateiro, testes LOPAT
116 (Levana + Oxidase + Podridão em batata + Arginina + Hipersensibilidade em Tabaco) (Fahy
117 e Persley, 1983; Schaad, 1988) e sequenciamento do gene 16S rRNA (Lane, 1991).

118 Para utilização nos experimentos, o isolado *Pst* foi cultivado em meio Kado 523 (Kado e
119 Heskett, 1970) (sacarose 10 g, caseína ácida hidrolisada 8 g, extrato de levedura 4 g, K₂HPO₄
120 2 g, MgSO₄.7H₂O 0,3 g, ágar 15 g, água destilada 1000 mL) pelo método de estrias (Silveira e
121 Mariano, 2005) por 24 horas a temperatura de 28 °C. Após este período, água de torneira foi
122 adicionada a placa de Petri contendo o crescimento bacteriano e a concentração da suspensão
123 foi ajustada em fotocolorímetro (Analyser[®]) a 540 nm de absorvância (A_{540nm}), de acordo com
124 equação pré-estabelecida onde: A₅₄₀ = 0,20 equivale a 1,0 × 10⁸ UFC mL⁻¹.

125 **Plantio**

126 Sementes de tomateiro da cultivar Santa Clara cedidas pela empresa Sakata Seed
127 Sudamerica (Bragança Paulista, São Paulo), foram semeadas em número de seis sementes por
128 vaso contendo uma mistura de solo esterilizado, húmus e areia, na proporção 3:1:1 (v:v).
129 Quinze dias após a semeadura, as plantas de tomateiro em cada vaso receberam 50 mL de
130 solução nutritiva, contendo em mg L⁻¹, 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de
131 MgSO₄.7H₂O, 61 de uréia, 0,27 de NH₄MO₇O₂₄.4H₂O, 1,61 de H₃BO₃, 6,67 de ZnSO₄, 1,74
132 de CuSO₄.5H₂O e 4,10 de MnCl₂.4H₂O, 4,08 de FeSO₄.7H₂O e 5,58 de EDTA bisódico. A
133 solução também foi aplicada na segunda e terceira semana após a semeadura. As plantas
134 foram mantidas em casa de vegetação, onde a temperatura variou de 20 a 30 °C, sendo
135 irrigadas diariamente.

136 **Pulverização dos indutores de resistência**

137 Plantas de tomateiro aos 33 dias após a semeadura receberam pulverizações dos
138 indutores ácido jasmônico (AJ) (Sigma-Aldrich, São Paulo), ethephon (ET) (Sigma-Aldrich,
139 São Paulo) e acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion[®], Syngenta, São Paulo) nas concentrações de
140 0,1 mM, 0,5 mM e 300 mg/L, respectivamente, 48 horas antes da inoculação (h.a.i.) com *Pst*.
141 Plantas pulverizadas com água destilada (AD) foram utilizadas como controle. Cada planta foi
142 pulverizada com 25 mL dos indutores ou com AD. Posteriormente, as plantas foram mantidas
143 em câmara de nevoeiro com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz, onde
144 permaneceram por 24 horas.

145 **Avaliação do período de incubação e do número de lesões da pinta bacteriana por planta**

146 Plantas de tomateiro foram inoculadas 48 horas após a pulverização dos indutores com
147 uma suspensão bacteriana na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, com auxílio de atomizador
148 De Vilbs n^o15. Às 24 h.a.i., as plantas foram transferidas para a casa de vegetação onde a
149 temperatura variou de 20 a 30 °C, sendo irrigadas diariamente. Avaliou-se o período de
150 incubação (PI) e número de lesões (NL) por planta nos cinco folíolos das folhas 1 e 2
151 totalmente expandidas de cada planta. O PI (dias) foi avaliado a cada 24 h.a.i. e foi definido
152 como o intervalo de tempo entre a inoculação e o aparecimento de lesões necróticas com halo
153 clorótico. O NL por planta foi avaliado aos quinze dias após inoculação (d.a.i.).

154 **Efeito do AJ e do ET no crescimento de *Pst in vitro***

155 *Pst* foi cultivada em meio Kado 523 líquido (sacarose 10 g, caseína ácida hidrolisada 8
156 g, extrato de levedura 4 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄.7H₂O 0,3 g, água destilada 1000 mL) (Kado e
157 Heskett, 1970) por 24 horas a temperatura de 28 °C. Em poços de placas tipo ELISA, a cada
158 250 µL de crescimento bacteriano foram adicionadas 0,25 µL e 1,25 µL de AJ e ET. Como
159 controle utilizou-se apenas meio de cultura. Após 24 horas, a absorbância em cada tratamento
160 foi medida em espectrofotômetro a 580 nm.

161 **Determinação da atividade das enzimas peroxidases (POX, EC 1.11.1.7),** 162 **polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1), β-1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39) e** 163 **lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12)**

164 Amostras das folhas 1 e 2 das plantas de tomateiro das repetições de cada tratamento
165 foram coletadas aos 2, 6, 9 e 12 d.a.i. Amostras de folhas de plantas não inoculadas com *Pst*
166 serviram como controle (0 d.a.i.). As amostras foram armazenadas individualmente em papel
167 alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N₂) líquido e, em seguida, armazenadas em
168 ultrafreezer a -80°C para posterior análise.

169 Para obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas POX,
170 PFO e GLU, amostras de 0,3 g de tecido foliar fresco foram maceradas com N₂ líquido em
171 almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até obtenção de um pó fino. O
172 pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) contendo
173 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF). O homogeneizado foi centrifugado a 20000
174 × g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante foi usado para as determinações enzimáticas. A
175 atividade das POX foi determinada pela oxidação do pirogalol de acordo com a metodologia
176 de Kar e Mishra (1976). Uma mistura de 950 µL de água destilada, 750 µL tampão fosfato de
177 potássio 100 mM (pH 6,8), 600 µL de pirogalol e 600 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM
178 foi adicionada a 20 µL do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm em espectrofotômetro
179 (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a cada 10 seg durante 1 min após
180 adição do extrato à mistura, totalizando cinco leituras. O coeficiente de extinção molar de 2,47
181 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade das POX (Chance e Maehley, 1955), a qual foi
182 expressa em mM de purpurogalina produzida por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Durante todo o
183 processo, os tubos de microcentrífuga foram cobertos com papel alumínio para proteger a
184 mistura da oxidação pela luz. A atividade das PFO foi determinada a semelhança das POX,
185 exceto que o peróxido de hidrogênio não foi usado na mistura.

186 A atividade das GLU foi determinada conforme descrito por Lever (1972). A reação foi
187 iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 230
188 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 250 µL do substrato laminarina (Sigma-
189 Aldrich, São Paulo) na concentração de 4 mg mL⁻¹. A mistura da reação foi incubada em
190 banho-maria por 30 min a 45 °C. Após o período de incubação, determinou-se a quantidade
191 de açúcares redutores através da adição de 250 µL de ácido dinitrosalicílico a mistura e, em
192 seguida, da sua incubação em banho-maria por 15 min a 100 °C. A reação foi interrompida
193 pelo resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura de 30 °C. Nas amostras
194 controle, a mistura de reação foi igual, exceto que o extrato vegetal foi adicionado após o
195 aquecimento da mistura a 100 °C. A absorbância do produto liberado pelas GLU foi medida a
196 540 nm e a atividade dessa enzima foi expressa em unidades de absorbância min⁻¹mg⁻¹ de
197 proteína.

198 Para obtenção do extrato para determinação enzimática das LOX, 0,2 g de tecido foliar
199 foi macerado com N₂ líquido em almofariz. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de
200 tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,8) contendo Triton-X 1% (v/v) e PVP 1%. O
201 homogeneizado foi centrifugado a 15000 × g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi usado
202 como extrato para determinação da atividade das LOX. A reação foi iniciada após adição de 7

203 μL do extrato à uma mistura contendo 790 μL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e
204 5 μL do substrato linoleato de sódio 10 mM. A atividade das LOX foi determinada conforme
205 metodologia descrita por Axelrod et al. (1981). A absorvância do produto liberado pelas LOX
206 foi medida em espectrofotômetro a 234 nm. O coeficiente de extinção molar de 25000 M^{-1}
207 cm^{-1} foi usado para determinar a atividade das LOX, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
208 de proteína.

209 A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o
210 método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

211 **Delineamento experimental e análises estatísticas**

212 Três experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com
213 quatro tratamentos sendo plantas pulverizadas com AJ, ET, ASM e AD e cinco repetições
214 para avaliação do PI e do NL. Testes de Cochran e Bartlett (Gomez e Gomez, 1994) não
215 indicaram homogeneidade de variância para os três experimentos, os quais foram analisados
216 separadamente. Os dados do PI, NL e do crescimento de *Pst in vitro* foram submetidos à
217 análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de
218 probabilidade. Apenas um experimento foi realizado para as avaliações bioquímicas. Os
219 dados da POX, PFO, GLU e LOX também foram submetidos à ANOVA e as médias
220 comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram
221 realizadas utilizando-se o software SAS (SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC).

222

223 **RESULTADOS**

224

225 **Período de incubação e número de lesões da pinta bacteriana por planta**

226 Com relação ao PI, não houve diferença significativa entre os tratamentos nos
227 experimentos (Exp.) 1 e 2 (Tabela 1). No Exp. 3, o PI aumentou significativamente em 1 dia
228 nas plantas pulverizadas com ASM em relação ao controle (AD), embora sem diferir
229 significativamente dos tratamentos AJ e ET (Tabela 1).

230 Com relação ao NL por planta, houve diferença significativa entre os tratamentos AJ,
231 ET e ASM em relação ao controle em todos os experimentos (Tabela 1). No Exp. 2, não
232 houve diferença significativa entre as plantas pulverizadas com AJ e ET e entre as plantas
233 pulverizadas com ET e ASM (Tabela 1). No Exp. 2, as plantas pulverizadas com AJ, ET e
234 ASM reduziram significativamente o NL por planta em 38,9, 45,3 e 68,1%, respectivamente,
235 em relação ao controle (Tabela 1).

236 **Efeito do AJ e ET no crescimento de *Pst in vitro***

237 O crescimento de *Pst* em meio de cultura não foi influenciado significativamente pelo
238 AJ ou pelo ET (Tabela 2).

239 **Atividade das enzimas POX, PFO, GLU e LOX**

240 O AJ elevou significativamente a atividade das POX em relação ao controle aos 6 e 12
241 d.a.i. (Fig. 1a). Não houve diferença entre os tratamentos quanto a atividade das POX para as
242 plantas não inoculadas com *Pst*, bem como aos 2 e 9 d.a.i. (Figura 1a).

243 A atividade das PFO foi significativamente maior nas plantas pulverizadas com AJ aos 0, 6 e
244 12 d.a.i. e com ASM aos 0 e 6 d.a.i. em relação ao controle (Figura 1b). Esta atividade não foi
245 significativamente elevada nas plantas pulverizadas com AJ, ET e ASM em relação ao
246 controle aos 2 e 9 d.a.i. (Figura 1b).

247 Não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle quanto a atividade
248 da GLU em plantas não inoculadas com *Pst* (Figura 1c). A atividade das GLU foi
249 significativamente maior nas plantas pulverizadas com AJ e ET em relação ao controle aos 2,
250 6, 9 e 12 d.a.i. (Figura 1c). Esta atividade foi significativamente elevada pelo ASM apenas aos
251 6 e 12 d.a.i. (Figura 1c).

252 Não houve diferença entre os tratamentos quanto a atividade das LOX para as plantas
253 não inoculadas com *Pst*, bem como aos 9 e 12 d.a.i. (Figura 1d). A atividade das LOX foi
254 significativamente maior nas plantas pulverizadas com ASM em relação ao controle aos 2 e 6
255 d.a.i., enquanto que o indutor ET apenas elevou significativamente a atividade das LOX em
256 relação ao controle aos 2 d.a.i. (Figura 1d).

257

258 **DISCUSSÃO**

259

260 Os resultados deste estudo demonstram claramente o efeito dos fitohormônios na
261 resistência e ativação de respostas de defesa nas plantas de tomateiro infectadas por *Pst*.

262 Os resultados deste estudo demonstram claramente o efeito dos fitohormônios na
263 resistência e ativação de respostas de defesa nas plantas de tomateiro infectadas por *Pst*.

264 O ASM prolongou significativamente o PI em 1 dia e também reduziu o NL por planta
265 nos três experimentos realizados. Estes resultados confirmam que o ASM atua na resistência
266 de plantas de tomateiro contra agentes fúngicos, bacterianos e virais (Benhamou e Belanger,
267 1998; Anfoka, 2000; Scarponi et al., 2001). Scarponi et al. (2001) observaram que a
268 pulverização de ASM nas folhas basais de tomateiro protegeu as folhas apicais contra a
269 infecção por *Pst*. Estes autores verificaram que o ASM foi completamente degradado dentro

270 da planta conferindo proteção pela ativação das respostas de defesa. Logo, a redução na
271 severidade da doença foi devido às condições no espaço intercelular tornarem-se
272 desfavoráveis ao crescimento da bactéria. Baysal et al. (2003) também demonstraram que
273 plantas de tomateiro pulverizadas com ASM e inoculadas com *C. michiganensis* subsp.
274 *michiganensis* apresentaram redução da severidade da doença em relação ao controle.

275 Da mesma forma que para o ASM, nos três experimentos houve redução no NL por
276 planta quando essas foram pulverizadas com AJ e ET em relação às plantas pulverizadas com
277 AD, demonstrando que os três indutores apresentaram basicamente o mesmo potencial em
278 reduzir o NL por planta. Estes resultados sugerem que o ET é modulador da resistência de
279 plantas conforme demonstrado em plantas de *Arabidopsis* infectadas por *Pst* (Van Loon et al.,
280 2006). Porém, pouco ainda se conhece sobre os papéis do AJ e do ET em interações
281 compatíveis envolvendo patógenos bacterianos. Entretanto, os sintomas de oídio em videiras
282 (*Erysiphe necator*) foram reduzidos por pulverizações metil jasmonato (Belhadg et al., 2006)
283 e com ET (Belhadg et al., 2008).

284 De acordo com O'Donnel et al. (2003), a produção dos sintomas da mancha bacteriana
285 do tomateiro, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* depende da ação conjunta
286 do AJ, ET e do ácido salicílico (AS). Embora não seja conhecida a relação específica
287 existente entre eles (O'Donnel et al., 2003), em alguns momentos, estes hormônios estão
288 envolvidos em determinados níveis de resistência do hospedeiro (Delaney et al, 1994;
289 Glazerbrook et al., 1996) e em outros casos, a ação destes hormônios está envolvida na
290 produção dos sintomas da doença, porém não afetando o crescimento do patógeno (O'Donnel
291 et al., 2003). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo no que se refere
292 ao efeito do AJ e do ET no crescimento de *Pst in vitro*. Para serem considerados indutores de
293 resistência, compostos químicos não devem possuir atividade inibitória direta sobre o
294 patógeno (Kessmann et al., 1994).

295 As defesas das plantas são reguladas por complexas rotas de sinalização envolvendo o
296 AJ, ET e AS (Van Wees et al., 1999; Kunkel e Brooks, 2002; Rojo et al., 2003). As POX
297 estão relacionadas com o processo de proteção antioxidativa, o qual catalisa a oxidação de
298 componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, além de promover o aumento na
299 síntese de lignina que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas
300 pelos patógenos (Kvaratskhelia et al., 1997). Em tomateiro, acredita-se que essa enzima esteja
301 envolvida na última etapa de lignificação da parede celular (Nicholson e Hammerschmidt,
302 1992). As PFO são responsáveis pela formação de quinonas, as quais apresentam atividade
303 antimicrobiana (Mayer e Staples, 2002).

304 É conhecido que o AJ atua como indutor de resistência por estimular a produção de
305 compostos como terpenóides e ativar genes que codificam para a expressão de enzimas como
306 peroxidases e polifenoloxidasas, que podem atuar contra muitos herbívoros em tomateiro e
307 em doenças em plantas (Thaler, 1999; Cortês, 2000). Entretanto, não foram encontrados na
308 literatura trabalhos que demonstrassem o efeito de pulverizações de metil jasmonato na
309 ativação de enzimas relacionadas à defesa do tomateiro à *Pst*.

310 No presente estudo, plantas pulverizadas com AJ apresentaram maior atividade das
311 POX e PFO aos 6 e 12 d.a.i. nas plantas inoculadas com *Pst*. Plantas pulverizadas com ASM
312 apresentaram maior atividade das POX e PFO nas plantas não inoculadas com *Pst* e aos 6
313 d.a.i. Assim, estas enzimas foram importantes no aumento das respostas de defesa do
314 tomateiro. Ngadze et al. (2011) também relacionaram aumentos nas atividades das POX e das
315 PFO com a maior resistência de tubérculos de batata à *Pectobacterium atrosepticum*, *P.*
316 *carotovorum* subsp. *brasiliensis* e *Dickeya* spp. Li e Steffens (2001) verificaram que maior
317 atividade das PFO resultou em aumento da resistência de tomates transgênicos à *Pst*. A
318 ativação de enzimas de defesa por ASM também tem sido verificada. Assim, a atividade das
319 POX foi claramente induzida nos estágios de plantas de tomates pulverizadas com ASM e
320 inoculadas com *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Cavalcanti et al., 2006a). Baysal et al. (2003)
321 também verificaram que plantas pulverizadas com ASM apresentaram maior atividade da
322 POX quando infectadas por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

323 As GLU são responsáveis por degradar a parede celular de fungos, contribuindo para a
324 geração de elicitores com potencial para ativar as respostas de defesas das plantas
325 (Mohammadi et al., 2002). No entanto, a função desta enzima hidrolítica na resistência de
326 plantas à infecção por patógenos bacterianos ainda é pouco conhecida (Cavalcanti et al.,
327 2006b). No presente trabalho, aumento significativo das GLU foi observado durante todo o
328 processo infeccioso por *Pst* em plantas pulverizadas com AJ e ET e aos 6 e 12 d.a.i., para o
329 ASM. Sabe-se que o ET pode ativar a percepção da planta em resposta ao ataque por
330 patógenos, induzindo as respostas de defesa das mesmas (Boller, 1991). Aumento na
331 atividade desta enzima também foi relatado em plantas de tomateiro pulverizadas com ASM e
332 inoculadas com *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Cavalcanti et al., 2006b). As enzimas GLU
333 também foram positivamente correlacionadas com a indução de resistência em plantas de
334 tomateiro inoculadas com *Pst* e pré tratadas com *Methylobacterium oryzae* (Indiragandhi et
335 al., 2008).

336 As LOX são dioxigenases que catalisam a oxigenação do ácido linoléico em
337 hidroperóxidos (Hildebrand, 1989), atuando nos ácidos graxos como o ácido linoléico, os

338 quais representam os principais substratos em plantas superiores destas enzimas (Axelrod et
339 al. 1981; Hildebrand, 1989). Estudos indicam que ferimentos e elicitores são sinais
340 extracelulares na via das LOX (Gardner, 1995). Verificou-se maior atividade das LOX nas
341 plantas pulverizadas com ET aos 2 d.a.i. e com ASM aos 2 e 6 d.a.i. Maior atividade das LOX
342 foi importante na redução do processo infeccioso incitado por *Pst*. Resultados semelhantes
343 foram encontrados por Koch et al. (1992) ao observarem que, tomateiros apresentavam maior
344 atividade das LOX em resposta a inoculação com *Pst* e *P. syringae* pv. *syringae*.

345 Os resultados deste estudo permitem concluir que a aplicação dos indutores AJ, ET e
346 ASM afetaram alguns dos componentes de resistência do tomateiro à pinta bacteriana, além
347 de aumentar a atividade das enzimas POX, PFO, GLU e LOX.

348

349 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

350

351 Anfoka GH. (2000) Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces
352 systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Volledung) to *cucumber*
353 *mosaic virus*. Crop Protection 19:401-405.

354

355 Axerold B, Chessbrough TM, Laakso S. (1981) Lipoxygenases from soybeans. Methods in
356 Enzymology 71:441-451.

357 Baysal O, Soylu EM, Soylu S. (2003) Induction of defence-related enzymes and resistance by
358 the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused
359 by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Pathology 52:747-753.

360

361 Belhadj A, Saigne C, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costed MF, Mérillon JM. (2006)
362 Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against
363 *Erysiphe necator*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:9119-9125.

364

365 Belhadj A, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costed MF, Mérillon JM. (2008) Ethephon
366 elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine Journal of Agricultural and Food
367 Chemistry 56:5781-5787.

368

369 Benelli AIH, Denardin ND, Forcelini CA. (2004) Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em
370 tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum*
371 subsp. *atrosepticum* atípica. Fitopatologia Brasileira 29:263-267.

372

373 Benhamou N, Bel anger R. (1998) Benzothiazole-mediated induced resistance to *Fusarium*
374 *oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* 118:1203-1212.

375

376 Boller T. (1991) Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Mattoo, AK, Suttle, JC
377 (eds.). *The plant hormone ethylene*. Boca Raton ,CRC Press, pp 293-314.

378

379 Bonaldo SM, Pascholati SF, Romeiro RS. (2005) Indução de resistência: no  es básicas e
380 perspectivas. In: Cavalcanti LS, DiPierro RM, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS.
381 (Eds.) *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba, FEALQ 13:11-27.

382

383 Bostock RM. (1999) Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers.
384 *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:99-109.

385

386 Bradford MN. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
387 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*
388 72:248-254.

389 Buzi A, Chilose G, De Sillo D, Magro P. (2004) Induction of resistance in melon to
390 *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-
391 methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology* 152:34-
392 42.

393

394 Cavalcanti FR, Resende MLV, Lima JPMS, Silveira, JAG, Oliveira, JTA. (2006a) Activities
395 of antioxidant and photosynthetic responses in tomato pr -treated by plant activators and
396 inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68:198-
397 208.

398

399 Cavalcanti FR, Resende MLV, Pereira RB, Costa JCB, Carvalho CPS. (2006b) Atividades de
400 quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha
401 bacteriana. *Fitopatologia Brasileira* 41:1721-1730.

402

403 Cavalcanti LS, Brunelli KR, Stangarlin JR. (2005) Aspectos bioquímicos e moleculares da
404 resistência induzida. In: Cavalcanti, L. S.; Di Piero, R. M.; Pascholati, S. F.; Resende, M. L.

- 405 V.; Romeiro, R. S. (Eds.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba,
406 FEALQ 13:81-124.
- 407
- 408 Chance B, Maehley AC. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*
409 2:764-775.
- 410 Cipollini DF, Redman AM. (1999) Age-dependent effects of jasmonic acid treatment and
411 wind exposure on foliar oxidase activity and insect resistance in tomato. *Journal of Chemical*
412 *Ecology* 25:271-281.
- 413
- 414 Cole DL. (1999) The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired
415 resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection* 18:267-273.
- 416
- 417 Cortês HP. (2000) Introdução aos Hormônios Vegetais. Embrapa, p. 131-157.
- 418
- 419 Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-
420 Rella M, Kessmann H, Ward EA, Ryals J. (1994) A central role of salicylic acid in plant
421 disease resistance. *Science* 266:1247-1250.
- 422
- 423 Embrapa-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Hortaliças, 2010.
424 Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/cultivares>. Acesso em: 26 fev. 2012.
- 425
- 426 Fahy PC, Perseley GJ. (1983) *Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide*. Sidney,
427 Academic Press, 393p.
- 428
- 429 Fan XT, Mattheis JP. (2000) Yellowing of broccoli in storage is reduced by 1-
430 methylcyclopropene. *HortScience* 35:885-887.
- 431
- 432 Gardner, WH. (1995) Biological roles and biochemistry of a lipoxygenase pathway.
433 *HortScience* 30:197-205.
- 434
- 435 Glazerbrook J, Rogers EE, Ausubel FM. (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with
436 enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143:973-982.
- 437

- 438 Glazerbrook J, Rogers EE, Ausubel FM. (1997) Use of *Arabidopsis* for genetics dissection
439 of plant defense responses. *Annual Review of Genetics* 31:547-569.
- 440
- 441 Gomez KA, Gomez AA. (1994) *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd Ed. New
442 York, USA, Wiley.
- 443
- 444 Görlach J, Volrath S, Knauf Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp, M,
445 Staub T, Ward E, Kessmann H. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of
446 systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8:
447 629-643.
- 448
- 449 Herman MAB, Davidson JK, Smart CD. (2008) Induction of plant defense gene expression by
450 plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes.
451 *Phytopathology* 98:1226-1232.
- 452
- 453 Hildebrand DF. (1989) Lipoxygenases. *Plant Physiology* 76:249-253.
- 454
- 455 Indiradandhi PI, Anandham R, Kim K, Yim W, Madhaiyan M, AS T. (2008) Induction of
456 defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by regulating the
457 stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-
458 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal Microbiology Biotechnology* 24:1037-
459 1045.
- 460
- 461 Kado CI, Heskett MG. (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
462 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976.
- 463
- 464 Kar M, Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice
465 leaf senescence. *Plant Physiology*. 57:315-319.
- 466
- 467 Kessmann HT, Staub T, Hofmann C, Maetzke AT, Herzob J, Ward E, Uknes S, Ryals J.
468 (1994) Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of*
469 *Phytopathology* 32:439-459.
- 470

- 471 Koch E, Meier BM, Eiben HG, Slusarenko A. (1992) A Lipoxygenase from leaves of tomato
472 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic Pseudomonads.
473 Plant Physiology 99:571-576.
474
- 475 Kunkel BN, Brooks DM. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense.
476 Current Opinion in Plant Biology 5:325-331.
477
- 478 Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF. (1997) Purification and characterization of a
479 novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. Plant Physiology 114:1237-1245.
480
- 481 Lane DJ. (1991) 16S/23 rRNA sequencing. In: Nucleid acid techniques in bacterial
482 systematic. Stackebrandt E, Goodfellow M (eds), Sons JW, New York, NY, pp 115-175.
483
- 484 Lever M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Analytical
485 Biochemistry 47:273-279.
486
- 487 Li L, Steffens C. (2001) Overexpression of polyphenoloxidase in transgenic tomato plants
488 results in enhanced bacterial disease resistance. Planta 215:239-247.
489
- 490 Mauch-Mani B, Metraux JP. (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant
491 pathogen attack. Annals of Botany 82:535-540.
492
- 493 Mariano RLR, Assis SMP. (2005) Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano
494 RLR, Silveira EB. (Eds.). Manual de Práticas em Fitobacteriologia. 2^a ed. Recife, PE, Brasil,
495 Universidade Federal Rural de Pernambuco, pp 67-109.
496
- 497 Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2007) Agrofit – Sistemas de
498 Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso
499 em: 26 fev. 2012.
500
- 501 Mayer AM, Staples RC. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry
502 60:551-565.
503

- 504 Mohammadi M, Roohparvar R, Torabi M. (2002) Induced chitinase activity in resistant wheat
505 leaves inoculated with an incompatible race of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal
506 agent of yellow rust disease. *Mycopathologia* 154:119-126.
507
- 508 Ngadze E, Icishahayo D, Coutinho TA, van der Waals JE. (2011). The role polyphenol
509 oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and total soluble phenols
510 in the resistance of potatoes to soft rot. *Plant disease* 96:186-192.
511
- 512 Nicholson RL, Hammerschmidt R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease
513 resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369-389.
514
- 515 O'Donnell PJ, Schmelz E, Block A, Miersch O, Wasternack C, Jones JB, Klee HJ. (2003)
516 Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense
517 response. *Plant Physiology* 133:1181-1189.
518
- 519 Oliveira SMA, Dantas SAF, Gurgel LMS. (2004) Indução de resistência em doenças pós-
520 colheita em frutas e hortaliças. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 12:343-371.
521
- 522 Pilowsky M, Zutra D. (1986) Reaction of tomato genotypes to the bacterial speck pathogen
523 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). *Phytoparasitica* 14:39-42.
524
- 525 Resende MLV, Barguil BM, Resende RS, Beserra Jr JEA, Salgado, SML. (2004) Induction or
526 resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and
527 coffee leaves and husks. *The International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced*
528 *Resistance*. University of Fribourg, 79 p.
529
- 530 Resende MLV, Nojosa JBA, Aguilar MAG, Silva LHCP, Niella GR, Carvalho GA, Giovani
531 G, Castro MC. (2000) Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis*
532 *perniciosa* através do benzotriazolozole (BTH). *Fitopatologia Brasileira* 25:149-156.
533
- 534 Rojo E, Solano R, Sánchez-Serrano J. (2003) Interactions between signaling compounds
535 involved in plant defense. *Journal Plant Growth Regulation* 22:82-98.
536

- 537 Romeiro AM, Kousik CS, Ritchie DF. (2001) Resistance to bacterial spot in bell pepper
538 induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease* 85:189-194.
539
- 540 Scarponi L, Buonauro R, Martinetti L. (2001) Persistence and translocation of a
541 benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against
542 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Pest Management Science* 57:262-268.
543
- 544 Schaad NW. (1988) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 2nd ed.,
545 Saint Paul, MN. APS Press. 158p.
546
- 547 Silva VL, Lopes CA. (1995) Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em
548 cultivo comercial de tomateiro industrial. *Fitopatologia Brasileira* 20:179-183.
549
- 550 Silva JRC, Souza RM, Zacarone AB, Silva LHCP, Castro AM. (2008) Bactérias endofíticas
551 no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta
552 bacteriana do tomateiro. *Ciência Agrotécnica* 32:1062-1072.
553
- 554 Silva MAS, Carmo MGF, Olivares FL, Pereira AJ. (2002) Termoterapia via calor seco no
555 tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv.
556 *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. *Fitopatologia Brasileira* 27:586-593.
557
- 558 Silva MB, Morandi MAB, Júnior TJP, Venzon M, Fonseca MCM. (2010) Extratos de plantas
559 e seus derivados no controle de doenças e pragas In: Venzon M, Júnior TJP, Pallini Filho A.
560 (coord.). *Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica*, Viçosa, MG,
561 Brasil, EPAMIG, pp 33-54.
562
- 563 Silveira EB, Mariano RLR. (2005) Isolamento de bactérias fitopatogênicas In: Mariano RLR,
564 Silveira EB. *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. Recife, PE, Brasil, UFRPE, pp 23-33.
565
- 566 Stockinger EJ, Walling LL. (1994) Pto3 e Pto 4: novel genes from *Lycopersicon hirsutum* var.
567 *glabrattum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Theoretical and*
568 *Applied Genetics* 89:879-994.
569

- 570 Stout MJ, Workman KV, Bostock RM, Duffey SS. (1998) Stimulation and attenuation of
571 induced resistance by elicitors and inhibitors of chemical induction in tomato (*Lycopersicon*
572 *esculetum*) foliage. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86:267-279.
- 573
- 574 Thaler JS. (1999) Induced resistance in agricultural crops: Effects of jasmonic acid on
575 herbivory and yield of tomato plants. *Environmental Entomology* 28:30-37.
- 576
- 577 Van Loon LC. (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related
578 proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103:753-765.
- 579
- 580 Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst JM. (2006) Ethylene as a modulator of disease
581 resistance in plants. *Plant Science* 11:184-191.
- 582
- 583 Van Wees SCM, Stewart EAM, Van Pelt JAV, Van Loon LC, Pieterse C. M. (1999)
584 Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate - and
585 jasmonate - dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National*
586 *Academic* 97:8711-8716.
- 587
- 588
- 589
- 590

591 **Tabela 1.** Período de incubação (PI) e número de lesões (NL) por planta em tomateiros
 592 pulverizados com ácido jasmônico (AJ), ethephon (ET), acibenzolar-S-metil (ASM) e água
 593 destilada (AD) e inoculados com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

594

Tratamentos	PI (dias)			NL por planta		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
AJ	6,0	6,0	5,6 ab	166,4 a	269,1 a	175,4 a
ET	6,0	6,1	5,6 ab	132,2 a	240,9 ab	193,9 a
ASM	6,4	5,4	6,0 a	163,2 a	140,6 b	156,9 a
AD	6,1	5,8	5,0 b	229,8 b	440,4 c	353,9 b
Valor de F	3,19 ^{ns}	1,83 ^{ns}	4,69 ^{**}	7,34 ^{**}	21,68 ^{**}	21,06 ^{**}
C. V. (%)	3,87	8,79	7,67	19,56	21,94	19,96

595 C. V. = coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente
 596 ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. ^{ns} = não significativo.

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618 **Tabela 2.** Efeito do ácido jasmônico (AJ) e do ethephon (ET) no crescimento de
619 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato in vitro*, avaliado pela absorvância

Tratmentos	Absorvância ¹
AJ	0,07 a ²
ET	0,09 a
AD	0,08 a
C. V. (%)	14,06

620 ¹Medida em espectrofotômetro a 580 nm. ²Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre
621 si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). $n = 4$.

622

623

624

625

626

627

628

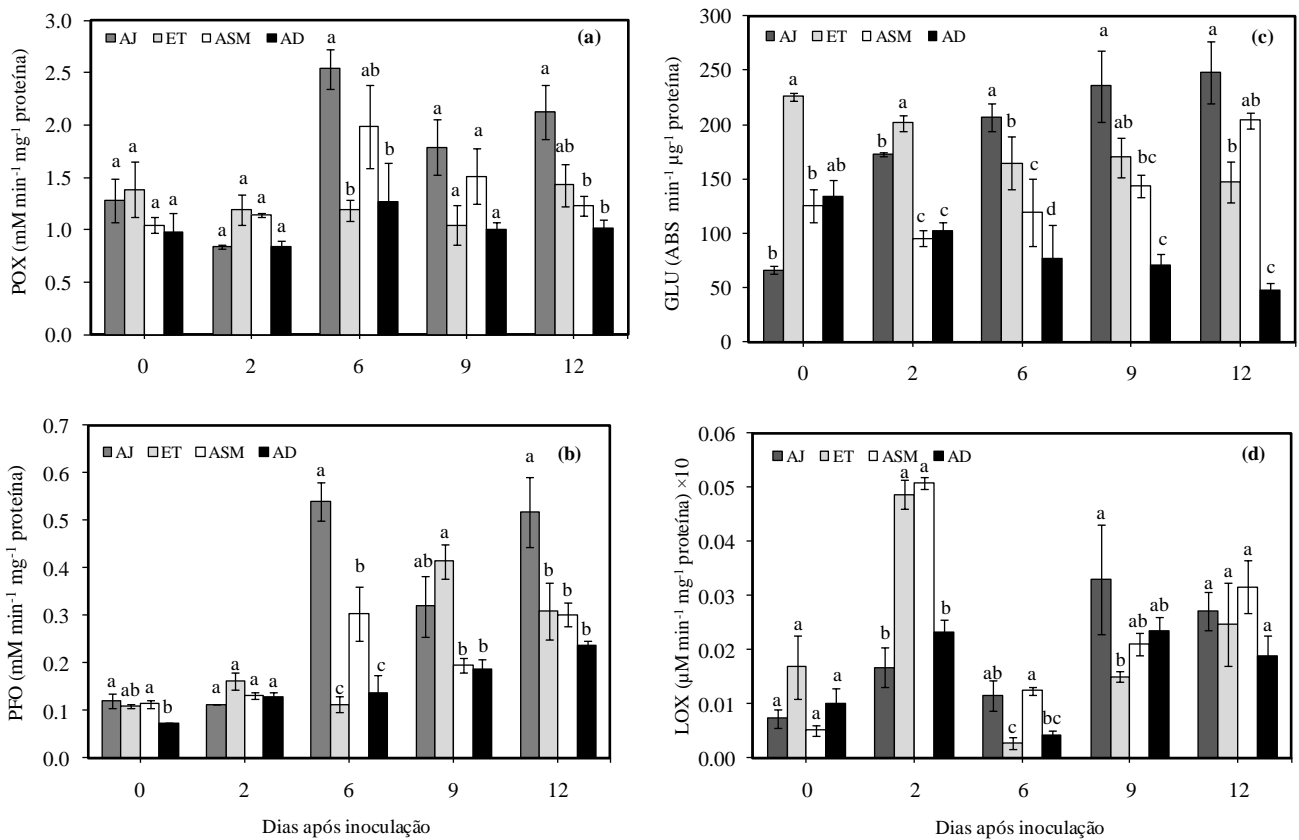
629

630

631

632

633



634 **Figura 1.** Atividade de peroxidases (POX) (a), polifenoloxidasas (PFO) (b), β -1,3-glucanases
 635 (GLU) (c) e lipoxigenases (LOX) (d) em folhas de tomateiro pulverizadas com ácido
 636 jasmônico (AJ), ethephon (ET), acibenzolar-S-metil (ASM) e água destilada (AD) e
 637 inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Médias seguidas pela mesma letra para
 638 cada época de avaliação não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- 1- A pulverização com Supa Silica[®] reduziu os sintomas da pinta bacteriana em tomateiro;
- 2- O Supa Silica[®] inibiu o crescimento da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato in vitro*;
- 3- As plantas pulverizadas com o Supa Silica[®] ou cultivadas em solo com silicato de cálcio apresentaram elevação da atividade das enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO) e β -1,3-glucanases (GLU), mas, aquelas cultivadas em solo com silicato de cálcio também apresentaram aumento da atividade das fenilalanina amônia-liases e lipoxigenases (LOX).
- 4- A pulverização dos indutores ácido jasmônico (AJ), ethephon (ET) e acibenzolar-S-metil (ASM) afetou o período de incubação e o número de lesões por planta;
- 5- Os indutores AJ e ET não inibiram o crescimento da *Pst in vitro*;
- 6- Plantas pulverizadas com os indutores AJ, ET e ASM apresentaram maiores atividades das enzimas POX, PFO, GLU e LOX.