

VIVIANE CARLA COSTA

**AVALIAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METIL, EXTRATO CÍTRICO E
FERMENTADO BACTERIANO NO CONTROLE DA MURCHA-
BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*) DO TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* Mill)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RENATO STANGARLIN

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
AGOSTO/2007

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, pelos seus constantes ensinamentos.

Ao meu filho e meu marido, pelo carinho, colaboração e apoio constantes.

Ao Prof. Mário César Lopes (*in memoriun*) pela idealização do trabalho e orientação inicial.

Ao Prof. José Renato Stangarlin, pela atenção, paciência e orientação no desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Marcelo Lang, pela sua ajuda incondicional.

A Gilmar Franzener pela sua colaboração no trabalho de laboratório e análise estatística.

Aos colegas de mestrado, pelos bons momentos vividos juntos que ficarão gravados na memória.

Aos demais professores e funcionários da UNIOESTE que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento desse trabalho, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. O PATOSSISTEMA TOMATE – <i>Ralstonia solanacearum</i>	10
2.1.1. A cultura do tomate	10
2.1.2. A doença murcha-bacteriana	11
2.1.2.1. Etiologia.....	11
2.1.2.2. Sintomas.....	12
2.1.2.3. Epidemiologia	13
2.1.2.4. Controle	13
2.2. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS.....	13
2.2.1. Mecanismos de defesa das plantas	14
2.3. SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	15
2.3.1. Indutores de resistência disponíveis comercialmente	17
2.3.1.1. Bion [®]	18
2.3.1.2. Ecolife [®] 40	19
2.3.1.3. Stubble-Aid [®]	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Localização do experimento	21
3.2. Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	21
3.3. Controle da murcha bacteriana em tomateiro.....	22
3.3.1. Produção de mudas e instalação do experimento.....	22
3.3.2. Produção de inóculo e processo de inoculação	25
3.3.3. Reisolamento de <i>R. solanacearum</i> das plantas inoculadas	26
3.3.4. Critérios de avaliação.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	28
4.1.1. Efeito do acibenzolar-S-metil na atividade antibacteriana.....	28
4.1.2. Efeito da biomassa cítrica	30
4.1.3. Efeito do fermentado bacteriano	32
4.2. Controle da murcha bacteriana em tomateiro com indutores de resistência	34

4.3. Reisolamento de <i>R. solanacearum</i> de tomateiro tratado com indutores de resistência.....	36
4.4. Observação de barreiras estruturais de defesa em tomateiro tratado com indutores de resistência e inoculadas com <i>R. solanacearum</i>	37
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Produtos e suas concentrações utilizadas no ensaio <i>in vitro</i> para inibição de crescimento de <i>R. solanacearum</i>	22
TABELA 2	Análise química do solo utilizado para preenchimento dos vasos do ensaio com tomateiro e <i>R. solanacearum</i>	23
TABELA 3	Tratamentos e produtos utilizados no experimento em campo com tomateiro e <i>R. solanacearum</i>	24
TABELA 4	Incidência de <i>R. solanacearum</i> em tomateiro tratado com indutores de resistência.....	35
TABELA 5	Isolamento de <i>R. solanacearum</i> de tomateiro cultivado em campo e tratado com produtos indutores de resistência.....	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mudas de tomateiro utilizadas no experimento de indução de resistência.....	24
FIGURA 2	Processo de raspagem da bactéria em placa para obtenção do inóculo.....	25
FIGURA 3	Inoculação de <i>R. solanacearum</i> no tomateiro cultivado em vaso.....	26
FIGURA 4	Crescimento <i>in vitro</i> de <i>R. solanacearum</i> biovars I (A) e III (B) em meio líquido contendo diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil. (CN) caldo nutriente; (AN) antibiótico (22,5 mg/L de oxitetraciclina + 225 mg/L de estreptomicina). Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados seguidos de sinal diferem da testemunha antibiótico para mais (+) ou para menos (-) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	29
FIGURA 5	Crescimento <i>in vitro</i> de <i>R. solanacearum</i> biovars I (A) e III (B) em meio líquido contendo diferentes concentrações de biomassa cítrica. (CN) caldo nutriente e (AN) antibiótico (22,5 mg/L de oxitetraciclina + 225 mg/L de estreptomicina) Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados seguidos de sinal diferem da testemunha antibiótico para mais (+) ou para menos (-) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	31
FIGURA 6	Crescimento <i>in vitro</i> de <i>R. solanacearum</i> biovars I (A) e III (B) em meio líquido contendo diferentes concentrações de fermentado bacteriano. (CN) caldo nutriente; (AN) antibiótico (22,5 mg/L de oxitetraciclina + 225 mg/L de estreptomicina). Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados seguidos de sinal diferem da testemunha antibiótico para mais (+) ou para menos (-) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	33
FIGURA 7	Fotomicrografias de cortes de hastes de tomateiro obtidas de plantas tratadas com indutores de resistência e inoculadas com <i>R. solanacearum</i> . (A) Fermentado bacteriano biovar III; (B) Biomassa cítrica biovar I; (C) Acibenzolar-S-metil biovar I; (D) Testemunha inoculada biovar I.....	38

RESUMO

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é uma das principais doenças que afetam a cultura de tomate (*Lycopersicon esculentum*). O controle da bactéria é difícil, pois a mesma sobrevive no solo, associada a restos culturais e na rizosfera de várias plantas. O uso de variedades resistentes é difícil pelo fato desta depender de condições ambientais e da concentração de inóculo da bactéria. Para tanto, torna-se imprescindível a realização de pesquisas que visem a obtenção de métodos alternativos para o controle da doença, já que não existe atualmente nenhum produto registrado para a mesma. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar a eficácia dos produtos abiótico acibenzolar-S-metil (ASM) e bióticos biomassa cítrica e fermentado bacteriano, em induzir resistência no tomateiro contra *R. solanacearum* biovars I e III. No ensaio *in vitro* para o ASM utilizaram-se as concentrações 10; 25; 100 e 200 mg/L; para a biomassa cítrica e fermentado bacteriano foram utilizadas as concentrações 0,025; 0,1; 0,2 e 0,4 mL/L. Oxitetraciclina (22,5 mg/L) + estreptomicina (225 mg/L) foi utilizado como controle positivo e apenas meio caldo nutriente como controle negativo. No ensaio *in vivo* utilizou-se para ASM a dose 0,05 g/L, para biomassa cítrica as doses 2,5 e 5 mL/L e fermentado bacteriano as doses 10 e 20 mL/L. Após quinze dias do transplante das mudas para os vasos as mesmas foram pulverizadas até plena cobertura foliar com os produtos totalizando 10 aplicações. Três dias após a primeira aplicação as plantas foram inoculadas com o patógeno através de ferimentos nas raízes. Os três produtos apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* contra *R. solanacearum*, sendo esta ação diferenciada em função da dose e dos biovars utilizados. Para ASM a inibição foi de até 99%, enquanto que para biomassa cítrica e fermentado bacteriano foi em média de 84% e 99%, respectivamente. O antibiótico inibiu entre 7,5 e 15% a multiplicação da bactéria. Nos ensaios *in vivo*, a biomassa cítrica na dose 5 mL/L e o fermentado bacteriano na dose 10 mL/L foram eficientes para o controle da murcha bacteriana causada pelo biovar I de *R. solanacearum*, enquanto que para o biovar III o controle foi obtido com ASM e fermentado bacteriano (10 mL/L). Nessas plantas com menor incidência da doença também se observou o menor índice de reisolamento da bactéria. Estes resultados indicam o potencial de ASM, biomassa cítrica e, principalmente do fermentado bacteriano, para controle de *R. solanacearum* em tomateiro.

ABSTRACT

The bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the main diseases that can reduce the productivity of tomato culture (*Lycopersicon esculentum*). The control of this pathogen is difficult, since the bacteria overwinter in plant debris, in diseased plants and in the soil. The use of resistance varieties is difficult because it depends on environmental conditions and amount of bacteria in the soil. Thus, it is necessary the development of alternative methods for the control of this disease, since there is no registered pesticide for this purpose. The objective of this work was to verify the effectiveness of the acibenzolar-S-methyl (ASM) abiotic product, and citric biomass and bacterial fermented extract biotic products in inducing resistance in the tomato against *R. solanacearum* biovars I and III. To *in vitro* assay the ASM was used at concentrations of 10, 25, 100 and 200 mg/L, while citric biomass and bacterial fermented extract were used at concentrations of 0.025, 0.1, 0.2 and 0.4 mL/L. Oxytetracycline (22.5 mg/L) + streptomycin (225 mg/L) was used as positive control and only culture medium as negative control. To *in vivo* assay the doses were 0.05 g/L for ASM, 2.5 and 5 mL/L for citric biomass and 10 and 20 mL/L bacterial fermented extract. After 15 days of transplanting the products were sprayed on the leaves, with a total of 10 applications. Three days after the first application the plants were inoculated with the pathogen through wounds in the roots. The results showed that the three products presented antibacterial activity against *R. solanacearum*, with differentiated action depend on the dose and biovar inoculated. For ASM the inhibition was of up to 99%, whereas for citric biomass and bacterial fermented extract it was 84% and 99%, respectively. The antibiotic inhibited between 7.5 and 15% the bacterium growth. To *in vivo* assay, the citric biomass 5 mL/L and bacterial fermented extract 10 mL/L reduced the bacterial wilt caused by biovar I of *R. solanacearum*, whereas to biovar III the control was obtained with bacterial fermented extract (10 mL/L) and ASM. In these plants with low incidence of wilt symptoms were observed the lower indexes of bacterium isolation in culture medium. These results indicate the potential of ASM, citric biomass and bacterial fermented extract for control of *R. solanacearum* in tomato plants.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, na maior parte dos segmentos da agricultura, produtos químicos são utilizados para controle de doenças em plantas, o que pode acarretar a contaminação de alimentos e do meio ambiente, intoxicação de homens e animais e seleção de isolados de patógenos insensíveis a estes produtos. Além desses, há métodos convencionais de controle, como práticas culturais e métodos físicos e genéticos, que não têm demonstrado efeitos desejados, especialmente quando utilizados isoladamente.

Alternativas para o controle de doenças podem ser realizadas através do controle biológico e da indução de resistência. A resistência induzida consiste em ativar os mecanismos de defesa da planta de modo que esta se defenda do ataque de patógenos. Os agentes de origem biótica ou abiótica, responsáveis por ativar ou induzir respostas de defesa nas plantas, são chamados de indutores.

A indústria de defensivos tem desenvolvido compostos objetivando a proteção de uma cultura contra fitopatógenos através da indução dos mecanismos de defesa da planta. Dentre esses, podemos citar a utilização de produtos a base de acibenzolar-S-metil e de polissacarídeos derivados da parede celular de fungos leveduriformes.

A murcha-bacteriana é uma das principais doenças que afetam e reduzem a produtividade na cultura de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), sendo causada pelo patógeno *Ralstonia solanacearum*. O controle é difícil, sobretudo onde as condições climáticas, como altas umidade e temperatura, favorecem a ocorrência da doença. Além de não haver produtos químicos registrados para o controle dessa doença em tomateiro, há poucos genótipos que apresentem razoável nível de resistência.

O objetivo deste trabalho foi testar a eficácia do produto abiótico químico acibenzolar-S-metil e dos produtos abióticos orgânicos biomassa cítrica e fermentado bacteriano em inibir o crescimento *in vitro* de *R. solanacearum* e em induzir resistência no tomateiro para o controle da murcha-bacteriana causada por este patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O PATOSSISTEMA TOMATE – *Ralstonia solanacearum*

2.1.1. A cultura do tomate

O tomate (*L. esculentum* Mill) é uma dicotiledônea da ordem *Tubiflorae* e pertencente à família *Solanaceae*, gênero *Lycopersicon*. A família *Solanaceae*, dentro do Reino Vegetal é uma das mais importantes, sendo composta por cerca de 90 gêneros com mais de 2.000 espécies. Dentre essas, o gênero *Lycopersicon* é composto por nove espécies, que inclui a espécie *L. esculentum*, esta rotineiramente cultivada (BARROSO, 1986).

Segundo Alvarenga (2004) o tomateiro é proveniente das Américas, sendo a região andina o centro de origem das espécies silvestres, compreendendo o norte do Chile ao Equador, sendo possivelmente o tomate-cereja o ancestral mais próximo dos cultivares atualmente plantados.

Os cultivares de tomateiro encontrados atualmente no mercado são linhagens uniformes, sendo as plantas tipicamente autógamas, com porcentagem de polinização cruzada reduzida, que pode ocorrer como resultado da ação de insetos polinizadores. Em regiões que apresentam clima temperado, as taxas de cruzamento natural variam de 0,5 a 4% (GIORDANO & SILVA, 1999).

Economicamente, o tomate é uma das hortaliças mais difundidas e cultivadas no mundo, sendo superada em volume de produção apenas pela batata (GIORDANO & SILVA, 1999). A área cultivada no Brasil no período 1996-2001, segundo Camargo Filho & Mazzei (2002) foi de 62.817 ha, quantificando 2,907 milhões de toneladas, com produtividade média de 46,75 t ha⁻¹. O estado de Goiás é considerado o maior produtor (23,6% do total do país), seguido por São Paulo (21,3%) e Minas Gerais (20,9%).

A cultura do tomate utiliza altos investimentos em agrotóxicos, com pulverizações a cada três dias, desde a emergência até a colheita, além de utilizar grande quantidade

de mão-de-obra e adubo do plantio à colheita, resultando em um alto custo de produção.

Dentre os fatores bióticos que envolvem a diminuição da rentabilidade da cultura do tomateiro, estão as doenças causadas por fitobactérias, que assumem papel de destaque. Diversos gêneros, espécies, subespécies e patovares de bactérias fitopatogênicas são responsáveis pela ocorrência de doenças nessa solanácea (JUNIOR, 2004).

2.1.2. A doença murcha-bacteriana

Entre as doenças do tomateiro, destaca-se a murcha bacteriana, considerada a bacteriose mais importante da cultura, tendo como agente causal a *Ralstonia solanacearum*, caracterizada como bactéria vascular, cujos efeitos são decorrentes da ação mecânica de entupimento dos vasos do xilema ou por ação de metabólitos que são lançados na seiva (JUNIOR, 2004).

O primeiro relato da murcha bacteriana no Brasil, segundo Takatsu & Lopes (1997) foi feito por Von Parseval, em 1922, em fumo e batata, no estado do Rio Grande do Sul. A partir disso, grande quantidade de informações sobre a ocorrência da doença em diversas espécies economicamente importantes foram divulgadas no Brasil, que refletiu a ampla distribuição do patógeno, assim como sua importância econômica (BRINGEL, 2002).

2.1.2.1. Etiologia

De acordo com Lopes & Santos (1994) a bactéria é caracterizada como gram negativa, aeróbica, bastonetiforme, medindo 0,5-0,7 a 1,5-2,5 μm , pertencente ao grupo não-fluorescente da família Pseudomonadaceae.

R. solanacearum infecta espécies pertencentes a mais de 50 famílias botânicas, sobretudo as solanáceas, além de afetar severamente espécies de outras famílias. Possui grande variabilidade genética; nas subespécies, os isolados são classificados

em cinco raças, conforme o grupo de espécies hospedeiras. Existe também a denominação de biovars determinada pelas características bioquímicas e nutricionais (ALVARENGA, 2004). A raça 1, constituída pelos biovars I e III, é responsável pela doença no tomateiro.

2.1.2.2. Sintomas

Os sintomas iniciais da doença incluem escurecimento da região vascular, mais visível na região próxima ao colo, murcha de folíolos e epinastia foliar, podendo ocorrer recuperação das plantas nas horas mais amenas do dia. Com o desenvolvimento da doença, esse estado de murcha afeta a planta toda, podendo inclusive levar a ocorrência de morte da planta infectada (KUROZAWA E PAVAN, 2005). Na base do caule é comum observar descoloração vascular de cor marrom (ALVARENGA, 2004).

As plantas infectadas que sobrevivem à murcha bacteriana apresentam nanismo e amarelecimento de folhas murchas, entretanto, a expressão dos sintomas varia de acordo com o hospedeiro e condições ambientais (GOTO, 1992). As plantas infectadas com estirpes pouco agressivas não murcham, mas apresentam sintomas de nanismo e formação de raízes adventícias. Plantas suscetíveis murcham repentinamente, quando infectadas com estirpes altamente agressivas do patógeno (GOTO, 1992; GRIMAULT et al., 1994).

Um método rápido de diagnóstico da doença é realizado com o teste do copo, onde pedaços de aproximadamente 3 cm são cortados da base do caule, e após bem lavados, são mergulhados em água limpa em copo transparente. Se um fluxo leitoso escorre após alguns minutos, da extremidade do caule em direção ao fundo do copo, o resultado é positivo (LOPES E SANTOS, 1994).

Outro teste rápido utiliza a câmara superúmida, que consiste em colocar planta com raízes em recipiente com água, cortar o caule a 10 cm do colo, aproximadamente, e cobri-lo com tubo de ensaio, de modo que esse tubo fique ao menos parcialmente imerso na água. Se a planta estiver infectada, em alguns minutos surgirão pequenas gotas de pus bacteriano, na região do corte (JUNIOR, 2004).

2.1.2.3. Epidemiologia

A bactéria sobrevive no solo associada a restos culturais, na rizosfera de várias plantas e associada às argilas no solo por vários anos, mesmo na ausência da planta hospedeira, portanto, em solo contaminado, a bactéria dificilmente é erradicada. Porém em solos orgânicos, o período de sobrevivência é menor, devido a maior atividade microbiana (ALVARENGA, 2004).

Os maiores danos decorrentes da doença ocorrem em condições de alta temperatura e alta umidade do solo, sendo limitante para a cultura do tomate nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil (JUNIOR, 2004).

2.1.2.4. Controle

O controle da murcha bacteriana é difícil, sobretudo em condições favoráveis a bactéria, tais como alta temperatura e umidade do solo. A obtenção de variedades com resistência é dificultada pelo fato desta depender de condições ambientais e da concentração de inóculo da bactéria (JUNIOR, 2004).

A adoção de algumas medidas ajudam no controle da doença como rotação de culturas com gramíneas, como milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar e pastagem; plantio em áreas onde não há registro de ocorrência da doença; isolamento de focos iniciais da doença, evitando irrigar as plantas contaminadas para não disseminar a bactéria, principalmente na irrigação por sulco; especial cuidado com água de irrigação, devido a possibilidade desta estar contaminada (KUROZAWA E PAVAN, 2005).

2.2. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS

Adicionalmente aos métodos culturais, físicos e genéticos, a indução de resistência é mais uma alternativa para controle da murcha bacteriana do tomateiro. Tal método consiste na ativação dos mecanismos de defesa latentes presentes na planta

hospedeira em resposta ao tratamento com agentes elicitores ou eliciadores, os chamados indutores de resistência (CAVALCANTI et al., 2005 a).

Após a elicitação, as plantas produzem sinais que são transportados por toda a planta e que desencadearão a resistência, promovendo uma proteção duradoura contra fitopatógenos (RYALS et al., 1996).

De acordo com Pascholati & Leite (1995) a resistência induzida apresenta duas características fundamentais: sistemicidade, onde após a indução de resistência, esta pode se expressar não só no sítio primário de inoculação mas de forma sistemática em tecidos distantes do local da primeira infecção, e a amplitude de efetividade, que resulta na ausência de especificidade da resistência induzida pelos diferentes indutores possíveis de uso e também com relação ao amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta é protegida.

A Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) é induzida por patógenos ou ativadores químicos, envolvendo o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com a Patogênese) como mecanismos de defesa da planta, sendo a indução dependente de ácido salicílico e podendo ocasionar o aparecimento de alterações visuais (necroses) na planta que teve seus mecanismos de defesa ativados (ROMEIRO, 1999).

Por outro lado, a Resistência Sistêmica Induzida (ISR) é ativada por não patógenos e é dependente de ácido jasmônico e etileno, não envolvendo a síntese de PRPs e não exibindo alterações perceptíveis (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

2.2.1. Mecanismos de defesa das plantas

A capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos é o que caracteriza propriamente a resistência (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A resistência é baseada, em sua grande maioria, na grande quantidade de barreiras e mecanismos de defesa já existentes e que independem do contato do inóculo com o sítio de infecção. Essas defesas são denominadas de constitutivas, inespecíficas ou estáticas. As plantas possuem, ainda, outros mecanismos de defesa os quais aparentemente permanecem inativos ou latentes, somente sendo ativados após serem elas expostas a agentes ativadores, podendo esses serem de origem

biótica ou abiótica, onde a resistência é dita dinâmica, pós-infeccional ou induzida (AGRIOS, 1997).

Os mecanismos de resistência das plantas são divididos em dois grupos: pré-formados (presentes na planta antes do contato com o patógeno) e pós-formados (produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno):

- Pré-formados (passivos ou constitutivos):
 - barreiras estruturais: cutícula, tricomas, estômatos e fibras ou vasos condutores;
 - bioquímicos: fenóis, alcalóides glicosídeos, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fototoxinas e proteínas relacionadas à patogênese.
- Pós-formados (ativos ou induzíveis):
 - barreiras estruturais formadas por papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses;
 - bioquímicos, sendo compostos por fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (CAVALCANTI et al., 2005 b).

2.3. SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Entre os elicitores ou indutores de resistência estão agentes bióticos, como microrganismos viáveis (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994) ou inativos, ou abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (HIJWEGWN et al., 1996) e acibenzolar-S-metil, além de metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005a).

Entre os elicitores não convencionais pode-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (compostos secundários) com propriedades antimicrobianas e/ou indutoras de resistência (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005), bem como os extratos de cogumelos (DI PIERO et al., 2005). Na literatura há vários exemplos do uso de elicitores não convencionais para o controle de doenças em plantas.

Balbi-Peña et al. (2006a, b) avaliaram a atividade fungitóxica *in vitro* e *in vivo* de extratos brutos aquosos de rizomas de cúrcuma e curcumina contra *Alternaria solani*.

A 7ª folha, após 26 dias do transplante, recebeu extrato de cúrcuma e curcumina sendo posteriormente inoculada com *A. solani*, assim como a 8ª folha (não tratada). A 7ª folha apresentou valores de área abaixo da curva de progresso da doença estatisticamente menores que a testemunha, podendo indicar indução de resistência local ou atividade antimicrobiana direta, caracterizando o potencial de cúrcuma e curcumina para o controle de pinta preta em tomateiro.

Bonaldo et al. (2004) avaliaram a indução de resistência em pepino contra o fitopatógeno *Colletotrichum lagenarium*, e observaram redução no número e tamanho das lesões, na primeira folha verdadeira da planta, quando extrato bruto de *E. citriodora* em concentração de 20% foi aplicado 72, 48 e 24 h antes da inoculação com o patógeno.

Dong et al. (2003) avaliaram micélio seco de *Penicillium chrysogenum* aplicado nas raízes de dois cultivares de *Gossypium hirsutum* e dois de *G. barbadense* para o controle de *Verticillium dahliae* Kleb. A aplicação através do solo apresentou proteção significativa contra a murcha de *Verticillium* em todos os cultivares testados. Como *P. chrysogenum* não demonstrou inibição do crescimento micelial de *V. dahliae* *in vitro*, o controle foi decorrente da resistência induzida. O tratamento com *P. chrysogenum* ocasionou aumento da atividade de peroxidase e da deposição de lignina nos hipocótilos de algodão.

Franzener et al. (2003) utilizaram extrato aquoso de cânfora (*Artemisia camphorata*) para o controle alternativo de *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo, observando que o extrato promoveu a indução de resistência sistêmica, reduzindo o tamanho e o número de lesões em plantas tratadas anteriormente à inoculação do patógeno.

Kuhn et al. (2006) analisaram a ação do extrato aquoso de cúrcuma contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. O extrato apresentou ação bactericida somente *in vitro*, sendo que nas concentrações utilizadas *in vivo* não apresentou nenhum efeito em manivas de mandioca infectadas com o patógeno.

Ooshiro et al. (2004) utilizaram pedaços da parte aérea e raízes de *Geranium carolinianum* L. para determinar a atividade antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha bacteriana em batata. O extrato obtido das plantas demonstrou grande atividade antimicrobiana contra este patógeno e também contra a sarna e a podridão da batata. No teste de campo o tratamento combinado com a técnica da solarização demonstrou elevado efeito para controle da murcha

bacteriana, o que sugere que *G. carolinianum* possa ser utilizado como agente biológico para controle da doença.

Piccinin et al. (2005) avaliaram a produtividade de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) tratados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, verificando o controle da antracnose causada por *Colletotrichum sublineolum* e da mancha foliar provocada por *Exserohilum turcicum*. Aplicações semanais de *S. cerevisiae* (Fermento Biológico Fleischmann – 25 mg/ml) reduziram significativamente a antracnose em sorgo cv. Tx-398B, melhorando a produtividade do mesmo. No cv. 910753, utilizou-se uma única aplicação com a levedura o que reduziu o progresso da mancha foliar. Porém, em nenhum tratamento a produtividade foi superior em relação à testemunha.

Silva & Bach (2004) analisaram a possibilidade de indução de resistência como método de controle de *Bipolaris sorokiniana* utilizando extrato de gengibre em plantas de cevada, relacionando com concentração de proteínas β -1,3-glucanase. A porcentagem de proteção foi acima de 90% tendo aumento em função do tempo (21,48 e 72 h) entre a aplicação do indutor e a inoculação com o patógeno. Nas análises bioquímicas dos extratos foliares dos referidos tratamentos, observou-se aumento na quantidade de proteína total da mesma forma que houve aumento na atividade da enzima β -1,3-glucanase.

Stevens et al. (1999) utilizaram baixa dose de ultra-violeta curto no tratamento de raízes de batata-doce, que foram armazenadas por trinta dias e após inoculadas com *Fusarium solani*. As raízes armazenadas após tratamento com UV-C mostraram redução do diâmetro das lesões, da profundidade e do peso do tecido apodrecido indicando aumento na resistência a podridão por *Fusarium*.

2.3.1. Indutores de resistência disponíveis comercialmente

A indústria de defensivos tem desenvolvido compostos capazes de protegerem uma cultura contra patógenos causadores de doenças através da indução de mecanismos de defesa da planta.

Dentre os agentes elicitores, manipulados comercialmente, podemos encontrar hoje no mercado produtos como Bion[®], Ecolife[®]₄₀ e Stubble-Aid[®] (SOBRINHO et al., 2005).

2.3.1.1. Bion®

O ingrediente ativo do produto é o Acibenzolar-S-metil (ASM), um análogo do ácido salicílico, que atua por meio da ativação dos mecanismos de defesa naturais das plantas. Apresenta baixa fitotoxidez e tem sido utilizado como indutor de resistência em várias espécies vegetais, como pepino, fumo, tomate, trigo e *Arabidopsis* (SOBRINHO et al., 2005). A seguir são apresentados alguns exemplos para controle de doenças do tipo murcha.

Araújo (2005) estudou a ação do acibenzolar-S-metil (ASM) na indução de resistência à murcha-bacteriana do tomateiro, causada por *Ralstonia solanacearum*. As plantas ativadas com o ASM em pulverização desenvolveram menos sintomas da murcha ao longo de todo o período do experimento, resultando em atraso no desenvolvimento da doença e redução de sua severidade, quando comparados aos controles.

Soares et al. (2004) avaliaram o efeito da indução de resistência promovido por ASM em três cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), com diferentes níveis de resistência à murcha de *Curtobacterium*, em dois ensaios distintos. O ASM foi ineficiente, tanto para controlar a doença no cultivar suscetível (IAC Carioca), quanto para elevar os níveis de resistência dos cultivares resistentes (IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã). A peroxidase apresentou maior atividade nas plantas pulverizadas com o indutor, tanto na folha, como no caule, e a polifenoloxidase apresentou maior atividade apenas no caule das plantas pulverizadas.

Calvacanti & Resende (2005) obtiveram reduções de até 55,4% na severidade da murcha de *Verticillium* em plântulas de cacaueteiro e um acréscimo na ordem de 10,5% no peso fresco e de 35,7% na altura das plantas em comparação com aquelas somente inoculadas com o fungo, evidenciando a eficácia do ASM como indutor de resistência em plântulas de cacaueteiro suscetíveis ao patógeno.

2.3.1.2. Ecolife®₄₀

De acordo com o Boletim Técnico Ecolife®₄₀, o produto é composto por ácidos ascórbico, cítrico e láctico, flavonóides e fitoalexinas cítricas, possuindo ação sinérgica, aumentando o vigor e a resistência das plantas às doenças.

Cavalcanti et al. (2006) avaliaram a influência de eliciadores biológicos e químicos sobre as atividades de duas proteínas relacionadas à patogênese e o potencial desses eliciadores na redução do progresso da mancha-foliar causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Plantas de tomateiro do cultivar Santa Cruz Kada foram pulverizadas com formulação biológica proveniente de biomassa cítrica sendo desafiadas com um isolado virulento da bactéria, quatro dias depois da pulverização. Plantas pulverizadas com o extrato biológico tiveram redução da mancha-bacteriana. *In vitro* o produto inibiu significativamente o crescimento da bactéria.

Motoyama et al. (2003 a) utilizaram diferentes concentrações de extrato cítrico, produto comercial Ecolife®₄₀ (1, 10, 100, 1000 e 5000 mg/L) para verificar a atividade antifúngica sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*, através do crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e peso seco de micélio. Também foram realizados ensaios para verificar a indução de fitoalexinas em sorgo e soja. O produto apresentou atividade antimicrobiana dependente da dose, onde a dose de 5000 mg/L inibiu em 71% e 49% o crescimento micelial de *C. lagenarium* e *F. semitectum*, respectivamente, enquanto que a esporulação foi inibida em 95% para *C. lagenarium* e estimulada para *F. semitectum*. A germinação de esporos foi 100% inibida para ambos os fungos. A produção de fitoalexinas foi 200% e 135% maior em relação aos tratamentos padrões em soja e sorgo, respectivamente.

2.3.1.3. Stubble-Aid®

O produto é resultado da fermentação de microorganismos e tem como objetivo criar condições de competição por espaço entre microrganismos benéficos e patogênicos, tendo-se mostrado muito eficiente em diferentes condições de uso (JI et al., 2004).

Momol et al. (2005) utilizaram diversos compostos antimicrobianos incluindo óleos essenciais ou seus constituintes funcionais, no pré-plantio de tomate como tratamentos do solo visando a redução ou eliminação da população de *R. solanacearum*. O uso do Stubble-Aid® no tratamento do solo diminuiu a população do patógeno e reduziu significativamente a doença em cultivares suscetíveis de tomateiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização do experimento

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Marechal Cândido Rondon, no período de maio de 2005 a novembro de 2006. O experimento *in vivo* foi conduzido em vasos, sob cultivo protegido, no Núcleo de Estação Experimental Prof. Dr. Mário César Lopes, no período de novembro de 2005 a junho de 2006.

3.2. Atividade antibacteriana *in vitro*

Para realização do experimento, foram utilizados os biovares I e III de *R. solanacearum* cedidos pela Embrapa – Hortaliças (Brasília/DF). Estes isolados foram mantidos em meio TZC (cloreto de tetrazólio) ou Meio de Kelman, sendo este composto por 10,0 g de peptona; 1,0 g de caseína hidrolisada; 5,0 g de glicose; 18,0 g de ágar, 0,05 g de 2,3,5-cloreto de trifinil tetrazólio e 1000 mL de água destilada (MARIANO, 2000).

Para os ensaios de atividade antibacteriana, os tubos de ensaio já contendo o meio de cultivo caldo nutriente (composto por 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona e 1000 mL de água destilada) foram autoclavados a 120 °C por 20 min, e em seguida as alíquotas dos produtos foram adicionados ao meio para obter as concentrações indicadas na Tabela 1, juntamente com uma alíquota de 10 µL da suspensão bacteriana contendo 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL, obtidas de colônias com 48 h de crescimento em meio de Kelman. Agrimicina foi utilizada como controle positivo e apenas o meio caldo nutriente como controle negativo.

Após 48 h de incubação em temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 580 nm em aparelho espectrofotômetro. O ensaio foi instalado no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um tubo de ensaio.

Tabela 1. Produtos e suas concentrações utilizadas no ensaio *in vitro* para inibição de crescimento de *R. solanacearum*

Produtos	Concentrações	
	mg i.a. L ⁻¹	mL. L ⁻¹
Acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion [®])	10	
	25	
	100	
	200	
Fermentado bacteriano (Stubble-Aid [®])		0,025
		0,1
		0,2
		0,4
Biomassa cítrica (Ecolife [®] ₄₀)		0,025
		0,1
		0,2
		0,4
Agrimicina [®] : oxitetraciclina + estreptomicina	22,5	
	225	

3.3. Controle da murcha bacteriana em tomateiro

3.3.1. Produção de mudas e instalação do experimento

Sementes de tomate do grupo Saladinha Híbrido F₁ foram semeadas em bandejas de isopor de 200 células contendo substrato Plantmax HA[®]. As mudas de tomate foram transplantadas para vasos plásticos de 5 L, quando estavam com três a cinco folhas definitivas, o que ocorreu 28 dias após a semeadura (ALVARENGA, 2004). O espaçamento adotado foi de 0,5 m entre plantas na linha e 1,0 entre linhas. Os vasos foram preenchidos com mistura que continha 800 L de solo, 200 L de areia, 1,5 Kg de adubo NPK 4-14-8 e 125 L de calcário calcítico por m³.

O solo para preenchimento dos vasos foi retirado da camada do horizonte A de áreas cultivadas com soja, sendo encaminhada uma amostra para o Laboratório de

Análise de Solo para verificação dos níveis de fertilidade (Tabela 2), sendo posteriormente suplementado com N-P-K conforme descrito acima.

O experimento foi conduzido sob cultivo protegido e as irrigações, o tutoramento vertical e o amarrio das plantas foram realizados à medida que se fizeram necessários.

Após 15 dias do transplante das mudas para os vasos (Figura 1), as mesmas foram pulverizadas até plena cobertura foliar com os produtos indutores de resistência (QUERINO et al., 2005). As doses utilizadas no experimento estão descritas na Tabela 3. As pulverizações foram feitas semanalmente, totalizando 10 aplicações.

O esquema experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado composto por 13 tratamentos, sendo que o ASM usado em dose única e a biomassa cítrica e o fermentado bacteriano utilizados na dose recomendada pelo fabricante e no dobro da dose. O restante dos tratamentos foi composto por duas testemunhas e dois biovars de *R. solanacearum*, com quatro repetições e quatro vasos por parcela, perfazendo um total de 208 plantas.

Tabela 2. Análise química do solo utilizado para preenchimento dos vasos do ensaio com tomateiro e *R. solanacearum*

P	MO	pH Ca Cl ₂	H+Al	Al ³⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V	Al
(mg. dm ⁻³)	(g. dm ⁻³)	(0,01 mol.L ⁻¹)	(Cmol _c . dm ⁻³)							(%)	
135,00	27,34	6,28	3,18	0,0	3,05	5,34	2,96	11,35	14,53	78,11	0,0

Tabela 3. Tratamentos e produtos utilizados no experimento em campo com tomateiro e *R. solanacearum*

Tratamentos	Biovar	Produtos
T1	I	Biomassa cítrica (mL. L ⁻¹): 2,5
T2		5,0
T3		Fermentado bacteriano (mL. L ⁻¹): 10
T4		20
T5		ASM (g i.a. L ⁻¹): 0,05
T6		Testemunha somente inoculada
T7	III	Biomassa cítrica (mL. L ⁻¹): 2,5
T8		5,0
T9		Fermentado bacteriano (mL. L ⁻¹): 10
T10		20
T11		ASM (g i.a. L ⁻¹): 0,05
T12		Testemunha somente inoculada
T13		Testemunha sem aplicação e sem inoculação

Posteriormente, após um período de três dias da primeira aplicação (BALBI-PEÑA et al., 2006b), tempo necessário para ativação dos mecanismos de defesa, as plantas de tomate foram inoculadas com o patógeno através de ferimentos nas raízes, causados com espátula.



Figura 1. Mudas de tomateiro utilizadas no experimento de indução de resistência.

3.3.2. Produção de inóculo e processo de inoculação

Para a inoculação, foram utilizadas colônias novas, com 48 h de cultivo em meio de Kelman. A partir das colônias, foi preparada uma suspensão com 1×10^6 UFC mL^{-1} , onde a bactéria foi retirada das placas através de raspagem juntamente com água destilada contendo 0,85% de NaCl (Figura 2.), sendo posteriormente recolhida em Erlenmeyer e ajustada para a concentração indicada.



Figura 2. Processo de raspagem da bactéria em placa para obtenção do inóculo.

As plantas foram inoculadas duas vezes. A primeira inoculação foi feita aos 18 dias após o transplante (DAT). Devido à falta de sintomas nas plantas inoculadas, inclusive nas testemunhas, realizou-se uma segunda inoculação aos 33 DAT.

A suspensão foi colocada nas raízes das plantas, através de uma pipeta graduada de 5 mL (Figura 3). Utilizou-se espátula para causar ferimento em algumas raízes, facilitando assim, o contato da planta com o patógeno (MARIANO, 2000).



Figura 3. Inoculação de *R. solanacearum* no tomateiro cultivado em vaso.

3.3.3. Reisolamento de *R. solanacearum* das plantas inoculadas

Ao final do experimento e da avaliação da incidência da murcha bacteriana, coletou-se cerca de 30 cm de caule de cinco plantas de cada tratamento, onde 5 cm foram armazenados em tubos plásticos contendo F.A.A e 20 cm utilizados para isolamento da bactéria.

Para a armazenagem do material em tubos plásticos utilizou-se uma solução de F.A.A. composta por formol, ácido acético e etanol 50%, em uma proporção de 5:5:90. Esse material foi utilizado para confecção de lâminas. Foram realizados cortes transversais extremamente finos, próximo a região do xilema, com auxílio de lâmina de barbear, para verificação de formação de tilose no material coletado. O material foi corado com azul de O-toluidina e analisado em microscópio óptico.

A parte do material correspondente aos 20 cm de caule foi utilizada para isolamento da bactéria usando-se tubos de microcentrífuga contendo 0,5 ml de solução salina (0,85% de NaCl) estéril. Pedacos de $\pm 0,5$ cm de comprimento, retirados próximo à região do xilema, foram colocados nessa solução e macerados com auxílio de bastão de vidro flambado. Com alça de platina retirou-se uma alíquota do macerado a qual foi espalhada sobre uma pequena área do meio de cultura próximo a um dos bordos da placa. Sem flambar a alça foram traçadas quatro riscas

paralelas espaçadas de 0,5 cm, sendo a primeira a 1 cm do local onde foi descarregada a suspensão. As quatro riscas não ultrapassaram o meio da placa. A alça foi flambada, e, depois de fria, foram feitas outras quatro riscas paralelas em ângulo reto, partindo da primeira risca da primeira série. Observando-se a mesma metodologia, foram traçadas outras quatro riscas paralelas, em ângulo reto com a segunda série, e, da mesma forma repetiu-se o traçado com a terceira série. A placa foi identificada, invertida e incubada a 25°C, para observar o aparecimento de colônias de *R. solanacearum* (KUHN et al., 2006).

3.3.4. Critérios de avaliação

O desenvolvimento da doença foi avaliado semanalmente durante sete semanas, começando-se quatro dias após a inoculação (OLIVEIRA et al., 1999), em horários de temperaturas mais amenas (NETTO et al., 2003).

Os critérios utilizados para avaliação foram a percentagem de plantas com sintomas da doença (ACOSTA et al., 1964) e observação da presença da bactéria nas plantas inoculadas (MONMA & SAKATA, 1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antibacteriana *in vitro*

4.1.1. Efeito do acibenzolar-S-metil na atividade antibacteriana

Para os dois biovars testados verificou-se relação inversa entre multiplicação bacteriana e produto, a partir da concentração de 10 mg. L⁻¹ (Figura 4.), em relação à testemunha que recebeu antibiótico, alcançando inibição quase total do crescimento na concentração de 200 mg. L⁻¹. Para esta concentração, a inibição foi de 99,8% e 92% para os biovars I e III, respectivamente, em relação ao tratamento com caldo nutriente. Em relação a este tratamento, o antibiótico inibiu em apenas 7,5% o biovar I e em 15% o biovar III. Isto indica alta atividade antibacteriana do ASM para *R. solanacearum*. Não houve alteração no valor de pH do meio de cultivo com a adição das diferentes concentrações de ASM.

Apesar de ser considerado um produto tipicamente indutor de resistência, alguns trabalhos têm indicado a atividade antimicrobiana do acibenzolar-S-metil. Osswald et al. (2005) avaliaram o efeito do ASM no tratamento de mesocótilos de sorgo, onde esse induziu o acúmulo da fitoalexina apigeninidina. Porém, nenhum efeito significativo foi observado sobre a indução de uma quitinase do sorgo. Adicionalmente, o produto também apresentou atividade antifúngica contra *Colletotrichum sublineolum*. A germinação de esporos foi inibida a partir da concentração de 0,1 mg. L⁻¹, alcançando até 85% de inibição para a concentração 100 mg. L⁻¹ de ASM. A formação de tubos germinativos e de apressórios foi inibida a partir da concentração de 5 mg. L⁻¹, atingindo valores de até 80% e 89% de inibição respectivamente, para a concentração de 100 mg. L⁻¹. O crescimento micelial foi inibido entre 50 e 80% para as concentrações de 100 e 200 mg. L⁻¹ de ASM.

Estes resultados diferem dos obtidos por Ruess et al. (1996) onde o ASM, em ensaios *in vitro* contra 19 fungos fitopatogênicos e também contra bactérias, não apresentou efeito tóxico a nenhum desses, embora se tenha usado a concentração de até 57 mg. L⁻¹. Também em estudo com *Blumeria graminis* f. sp. tritici em trigo, o ASM

mostrou efeito significativo na inibição da taxa de penetração do fungo, assim como na formação de haustórios primário e secundário, entretanto, a taxa de germinação e formação de apressórios não foi alterada (GORLACH et al., 1996). Também Cavalcanti et al. (2006) não verificaram atividade antibacteriana de acibenzolar-S-metil ($0,2 \text{ g. L}^{-1}$) contra *Xanthomonas vesicatoria* em ensaios de indução de resistência no tomateiro.

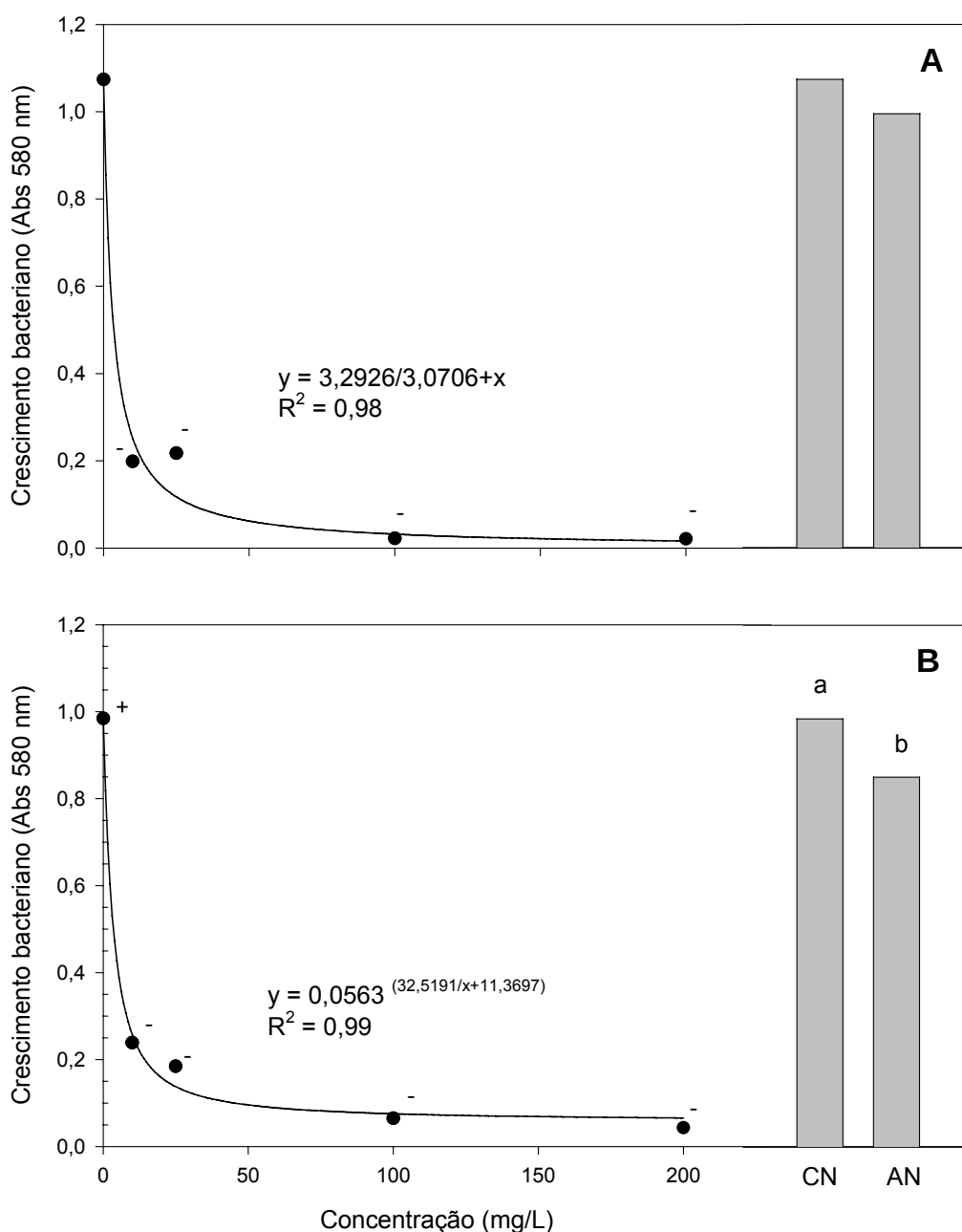


Figura 4. Crescimento *in vitro* de *R. solanacearum* biovars I (A) e III (B) em meio líquido contendo diferentes concentrações de acibenzolar-S-metil. (CN) caldo nutriente; (AN) antibiótico (22,5 mg/L de oxitetraciclina + 225 mg/L de estreptomicina). Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados seguidos de sinal diferem da testemunha antibiótico para mais (+) ou para menos (-) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.2. Efeito da biomassa cítrica

A atividade antimicrobiana de biomassa cítrica sobre *R. solanacearum* pode ser observada na Figura 4. Para o biovar I a inibição do crescimento bacteriano foi em torno de 83% em relação ao tratamento apenas com meio de cultura. O antibiótico inibiu em apenas 9% o crescimento. Para o biovar III a biomassa cítrica inibiu em média 84% o crescimento bacteriano e já para a menor concentração testada a inibição foi de 91%. O antibiótico inibiu em apenas 14% o crescimento. Não houve alteração no valor de pH do meio de cultivo com a adição das diferentes concentrações do produto.

Motoyama et al. (2003 b) avaliaram o potencial do extrato cítrico na atividade antimicrobiana. O produto foi testado nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 e 5000 ppm ou µL/L sobre as bactérias *R. solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, avaliando o halo de inibição, densidade óptica e número de unidades formadoras de colônias. O extrato cítrico apresentou atividade antimicrobiana dose-dependente, com inibição do crescimento bacteriano a partir de 100 ppm, com 100% de inibição para a concentração de 5000 ppm. Neste trabalho, a concentração mínima testada foi de 25 ppm e a máxima de 400 ppm e, para este intervalo, os valores de inibição foram semelhantes aos encontrados no trabalho de Motoyama et al. (2003 b).

Padmavati et al. (1997) avaliaram a sensibilidade de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a certos flavonóides usando disco de papel. Os autores observaram que naringenina (primeiro intermediário da via de flavonóides) na concentração de 25 µg/disco inibiu o crescimento de 6 estirpes de *Xanthomonas*. A sensibilidade a naringenina (flavone), dihidroquercetina (dihidroflavonol), kaempferol e quercetina (flavonols) foi significativamente variável entre os patógenos. A dihidroquercetina inibiu apenas duas estirpes e não teve efeito sobre as demais. Muitos destes componentes estão presentes na formulação do Ecolife[®] 40, o produto comercial utilizado neste trabalho.

Cavalcanti et al. (2006), em trabalho com biomassa cítrica (5mL. L⁻¹) para indução de respostas de defesa em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*, verificaram nos ensaios *in vitro* inibição do crescimento da bactéria na presença desse composto, o que corrobora para a atividade antibacteriana desse produto.

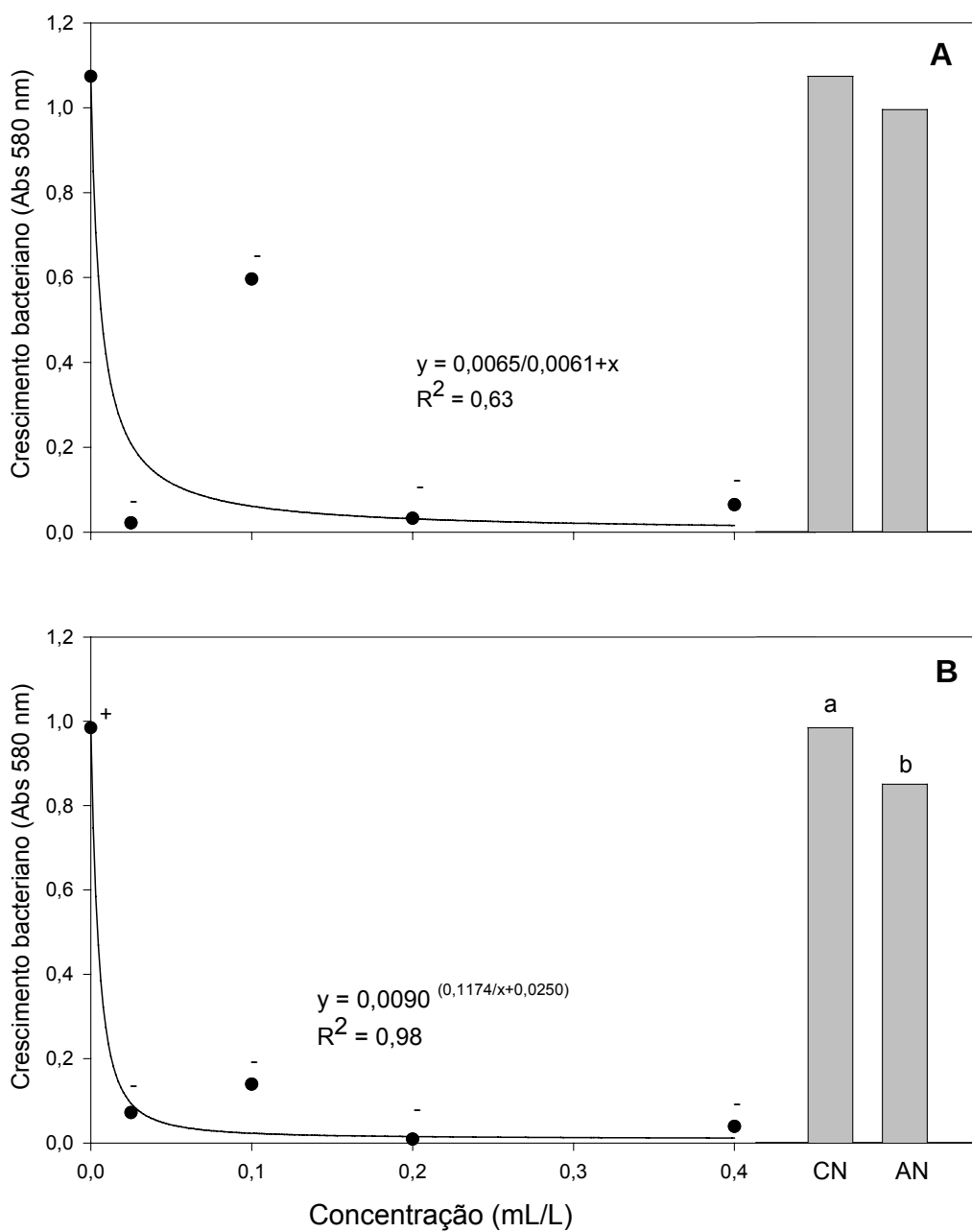


Figura 5. Crescimento *in vitro* de *R. solanacearum* biovars I (A) e III (B) em meio líquido contendo diferentes concentrações de biomassa cítrica. (CN) caldo nutriente; (AN) antibiótico (22,5 mg/L de oxitetraciclina + 225 mg/L de estreptomicina). Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados seguidos de sinal diferem da testemunha antibiótico para mais (+) ou para menos (-) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.3. Efeito do fermentado bacteriano

Para o biovar I o produto na dose de $0,025 \text{ mL.L}^{-1}$ apresentou controle relativamente baixo (21%) sobre o crescimento bacteriano, quando comparado ao CN (Figura 5 A). O produto apresentou controle eficaz sobre o desenvolvimento da bactéria na concentração de $0,4 \text{ mL. L}^{-1}$ tanto para o biovar I como para o III quando comparado com a testemunha com antibiótico. Para o biovar III a inibição do crescimento para a menor concentração testada foi de 83%, enquanto que o antibiótico inibiu em apenas 15% a multiplicação desse biovar. Não houve alteração no valor de pH do meio de cultivo com a adição das diferentes concentrações do produto.

Na literatura não há nenhum relato da atividade antimicrobiana do fermentado bacteriano utilizado neste trabalho.

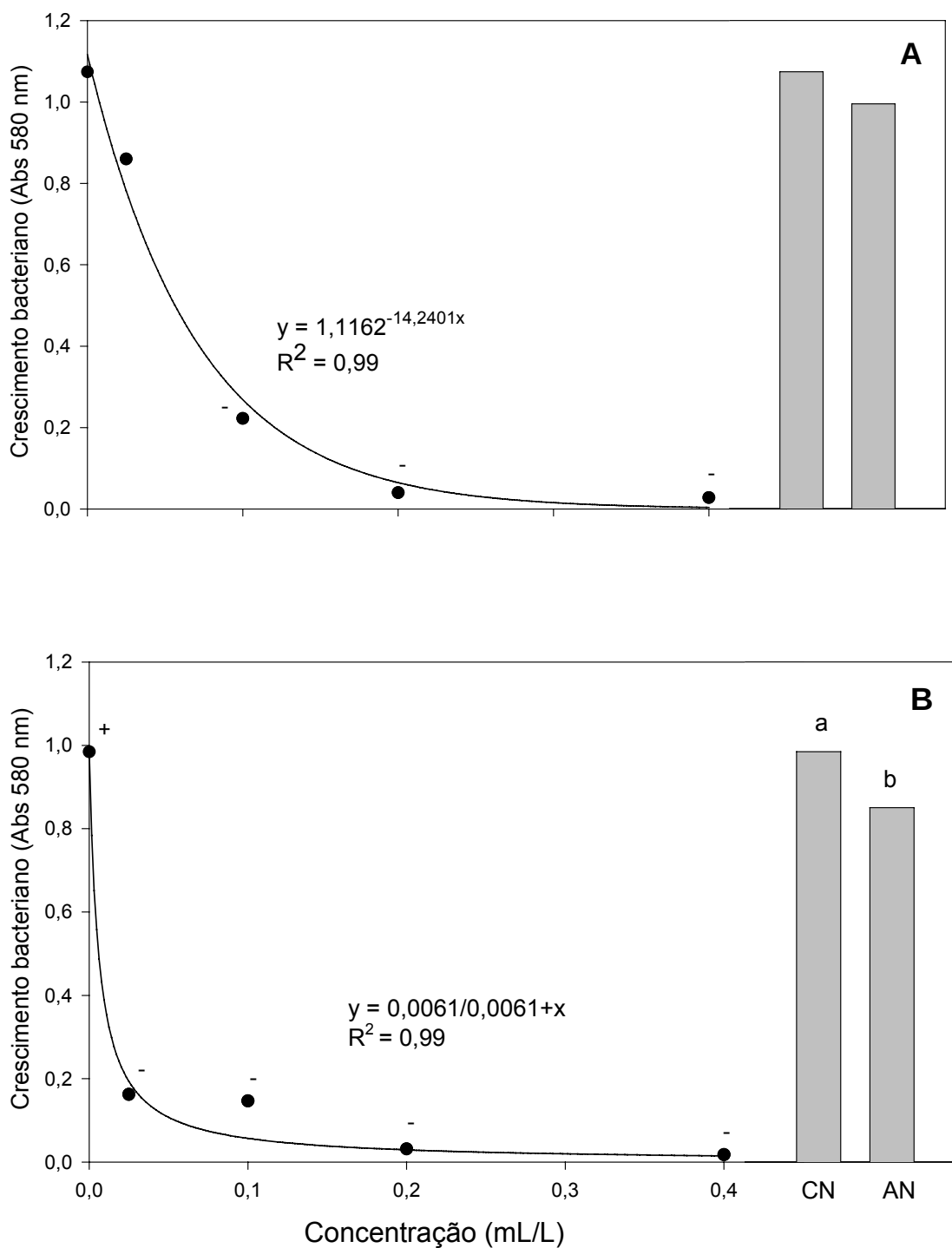


Figura 6. Crescimento *in vitro* de *R. solanacearum* biovars I (A) e III (B) em meio líquido contendo diferentes concentrações de fermentado bacteriano. (CN) caldo nutriente; (AN) antibiótico (22,5 mg/L de oxitetraciclina + 225 mg/L de estreptomicina). Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados seguidos de sinal diferem da testemunha antibiótico para mais (+) ou para menos (-) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2. Controle da murcha bacteriana em tomateiro com indutores de resistência

A avaliação da incidência foi realizada semanalmente, e para análise estatística, observou-se a última avaliação das sete avaliações realizadas (Tabela 4.).

Para o biovar I o acibenzolar-S-metil e biomassa cítrica na dose 2,5 mL. L⁻¹, juntamente com fermentado bacteriano na dose 20 mL. L⁻¹, não houve controle da murcha bacteriana, da mesma maneira que a biomassa cítrica nas duas concentrações testadas e o fermentado bacteriano na dose 20 mL. L⁻¹, não foram eficientes no controle do patógeno biovar III.

Entretanto, para o biovar I a biomassa cítrica na dose 5,0 mL.L⁻¹ e o fermentado bacteriano na dose 10 mL. L⁻¹, demonstraram controle sobre a doença nas plantas em casa de vegetação, o que também ocorreu com os produtos acibenzolar-S-metil e fermentado bacteriano na dose 10 mL. L⁻¹ quando avaliados no controle da biovar III. Tendo em vista a baixa incidência ou mesmo ausência de sintomas de murcha bacteriana nas plantas desses tratamentos, podemos supor que tais produtos nas concentrações e biovares avaliados, podem ser utilizados no controle de murcha bacteriana em tomateiro, o que pode ser confirmado pelo reisolamento do patógeno realizado no final do experimento, que nesses tratamentos também indicou baixa ou nenhuma presença de *R. solanacearum*.

Cavalcanti et al. (2006) não obtiveram tão bom resultado ao avaliar a eficácia da pulverização foliar em tomateiro com acibenzolar-S-metil (ASM) (0,2 g. L⁻¹) e biomassa cítrica (5 mL. L⁻¹) na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, onde houve proteção de 47,7% e 39,2%, respectivamente. A resistência induzida em plantas pulverizadas com ASM e biomassa cítrica foi evidenciada pelo aumento da atividade de peroxidases e oxidases, sendo que estas obtiveram discreto aumento no acúmulo de lignina.

Ji et al. (2004) verificaram que a aplicação de fermentado bacteriano (Stubble-Aid®), juntamente com outros compostos da empresa Improcrop (ISR 2000 e Agromós), protegeu de forma significativa as plantas de tomate cultivar Solar Set contra a murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*. Dez dias após a inoculação a proteção foi de 100%, enquanto que 21 dias após a inoculação e quatro semanas após o transplante a incidência de murcha foi de 24% e 40% respectivamente, contra 100% de sintomas de murcha para plantas não tratadas.

Pradhanang et al. (2005) investigaram o efeito do acibenzolar-S-metil (produto comercial Actizard 50 WG) em induzir resistência em tomateiro a *R. solanacearum* biovar I. O ASM não reduziu a incidência de murcha nos materiais suscetíveis, enquanto que em genótipos moderadamente resistentes, a pulverização de ASM a $0,003 \text{ g. L}^{-1}$ preveniu a dispersão interna da bactéria para regiões superiores do caule de plantas tratadas, reduzindo assim a incidência da doença. Neste trabalho, o ASM, testado em dose quase 17 vezes maior, não foi eficiente em reduzir a incidência de murcha causada pelo biovar I. O controle da biovar I de *R. solanacearum* em tomateiro também foi obtido por Hacısalihoglu et al. (2007) quando ASM ($0,025 \text{ g. L}^{-1}$), que equivale a metade da dose utilizada neste trabalho, foi pulverizado nas folhas, juntamente com aplicação no solo ($0,0125 \text{ g. L}^{-1}$), cinco dias antes da inoculação apenas com baixa concentração de inóculo do patógeno ($5 \times 10^4 \text{ u.f.c. mL}^{-1}$). Quando se utilizou concentração mais alta de inóculo ($5 \times 10^7 \text{ u.f.c. mL}^{-1}$), semelhante à utilizada neste trabalho ($1 \times 10^6 \text{ u.f.c. mL}^{-1}$), a redução da incidência de murcha não foi significativa, mesmo quando se realizaram duas pulverizações foliares.

Tabela 4. Incidência de *R. solanacearum* em tomateiro tratado com indutores de resistência

Tratamentos	Incidência (%)	
	Biovar I	Biovar III
Acibenzolar-S-metil (g. L^{-1})		
0,05	43.75 a*	6.25 b*
Biomassa cítrica (mL. L^{-1})		
2,5	31.25 a	31.25 a
5,0	0,0 b	37.5 a
Fermentado bacteriano (mL. L^{-1})		
10	12.5 b	0,0 b
20	43.75 a	56.25 a
Plantas somente inoculadas	81.25 a	75 a
Plantas não inoculadas	0,0 b	0,0 b
C.V. (%)	60,78	

* Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

4.3. Reisolamento de *R. solanacearum* de tomateiro tratado com indutores de resistência

Ao contrário do que ocorreu no experimento *in vitro*, nem todas as concentrações dos produtos tipicamente indutores de resistência, proporcionaram o controle dos biovars testados. Esse resultado pode ser observado na Tabela 5. onde para o biovar I o acibenzolar-S-metil, a biomassa cítrica na dose 2,5 mL. L⁻¹ e o fermentado bacteriano na dose 20 mL. L⁻¹ não apresentaram controle sobre o patógeno desafiador, pois este se encontrou presente nas hastes das plantas desses tratamentos, da mesma maneira que para biovar III a biomassa cítrica, nas duas concentrações avaliadas, foi estatisticamente semelhante ao tratamento das plantas somente inoculadas, não sendo portanto o produto eficiente para esse biovar.

Tabela 5. Isolamento de *R. solanacearum* de tomateiro cultivado em campo e tratado com produtos indutores de resistência.

Tratamentos	Hastes com presença da bactéria (%)	
	Biovar I	Biovar III
Acibenzolar-S-metil (g i.a. L ⁻¹)		
0,05	100 a*	40 b*
Biomassa cítrica (mL. L ⁻¹)		
2,5	100 a	100 a
5,0	40 b	80 a
Fermentado bacteriano (mL. L ⁻¹)		
10	40 b	40 b
20	100 a	60 a
Plantas somente inoculadas	100 a	100 a
Plantas não inoculadas	20 b	
C.V. (%)	36,86	

* Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade

Apesar dos produtos, em algumas das doses em que foram testados, não terem sido eficientes para o controle da doença nos dois biovars utilizados, a biomassa

cítrica na dose 5 mL. L⁻¹ e o fermentado bacteriano na dose 10 mL. L⁻¹, para o biovar I, mesmo apresentando algumas placas com a presença de *R. solanacearum*, demonstraram controle efetivo sobre o desenvolvimento desse patógeno, sendo estatisticamente semelhantes à testemunha não inoculada. Da mesma maneira que para o biovar III os produtos acibenzolar-S-metil e fermentado bacteriano na dose 10 mL. L⁻¹, apresentaram eficácia no controle da doença. Pode-se observar que o fermentado bacteriano na dose 10 mL. L⁻¹, conteve a colonização da bactéria nos dois biovars testados.

4.4. Observação de barreiras estruturais de defesa em tomateiro tratado com indutores de resistência e inoculadas com *R. solanacearum*

Foram confeccionadas 10 lâminas por tratamento, sendo que em nenhum desses materiais visualizados, constatou-se a presença de tilose ou qualquer outra barreira estrutural, que pudesse impedir a colonização da bactéria. Mesmo nos tratamentos que foi verificada a ausência da bactéria no isolamento em laboratório, não houve formação de nenhuma barreira que explicasse o motivo pelo qual a bactéria não se encontrava no xilema dessas plantas, apesar de as mesmas terem sido inoculadas (Figura 7).

Esse resultado difere do encontrado por Grimault et al. (1994), que verificaram a presença de tilose nos cultivares de tomate Floradel e Caraibo, suscetível e resistente, respectivamente a *R. solanacearum*. No cultivar suscetível as bactérias se encontravam em duas regiões do xilema: protoxilema e metaxilema, sendo mais abundante no último. Ao lado dos vasos colonizados se encontrava a formação de tiloses. Já no cultivar resistente, a formação de tiloses ocorreu principalmente no protoxilema nos vasos que estavam colonizados, sendo que para ambos cultivares não foi verificada nenhuma formação de tilose no controle não inoculado.

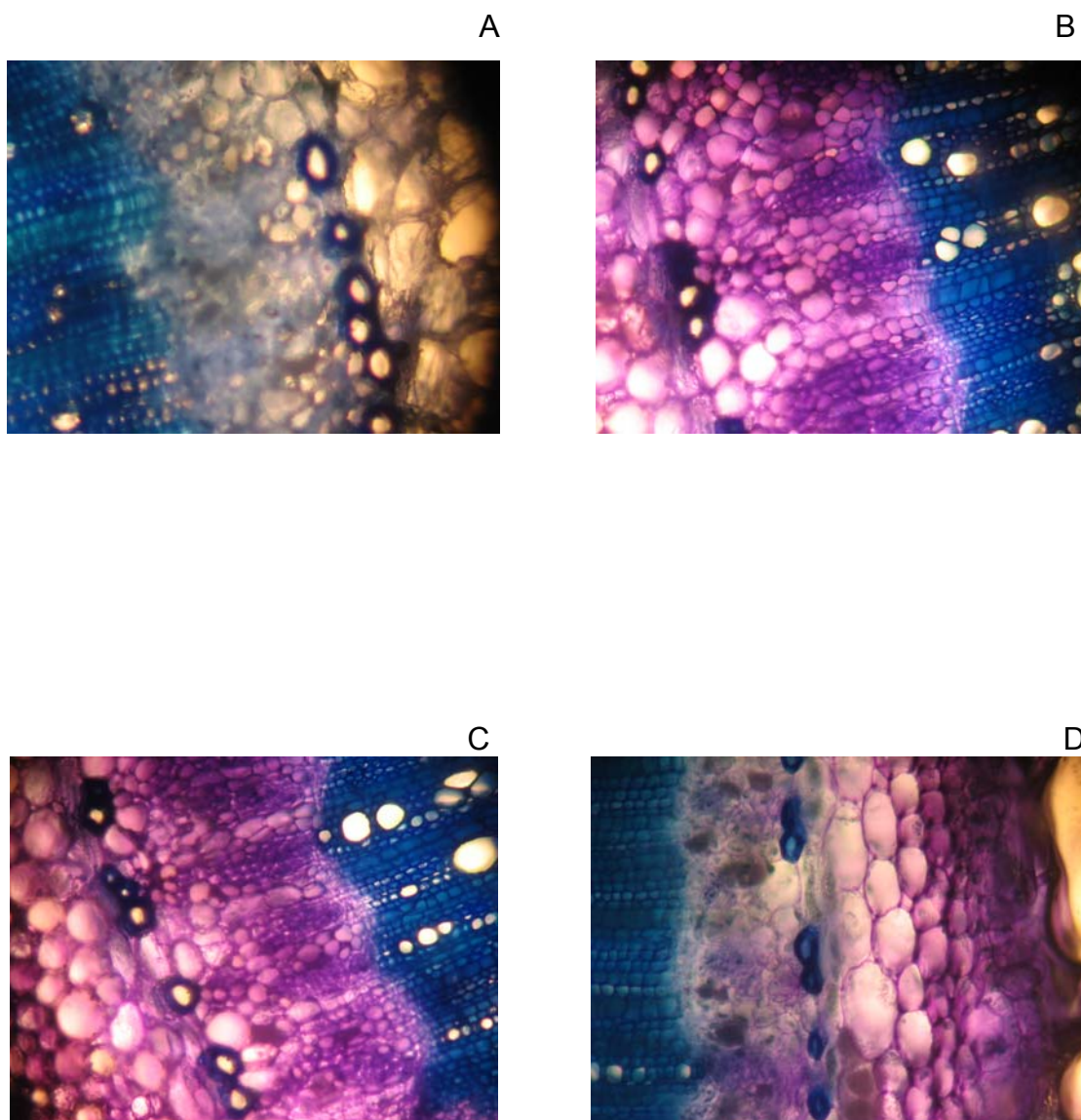


Figura 7. Fotomicrografias de cortes de hastes de tomateiro obtidas de plantas tratadas com indutores de resistência e inoculadas com *R. solanacearum*. (A) Fermentado bacteriano biovar III; (B) Biomassa cítrica biovar I; (C) Acibenzolar-S-metil biovar I; (D) Testemunha inoculada biovar I.

5. CONCLUSÕES

a- Acibenzolar-S-metil, biomassa cítrica e fermentado bacteriano possuem ação bactericida *in vitro* contra *R. solanacearum*, biovars I e III, sendo esta ação diferenciada em função da dose e dos biovars utilizados;

b- Os produtos biomassa cítrica, fermentado bacteriano e acibenzolar-S-metil possuem potencial para controle da murcha bacteriana do tomateiro causada por *R. solanacearum* em cultivo protegido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, J.C.; GILBERT, J.C.; QUINON, V.L. Heritability of bacterial wilt resistance in tomato. *Proc. J. Am. Soc. Hortic. Sci.* v. 84, p.455-462, 1964.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4º ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, p.15-275, 2004.
- ARAÚJO, J.S.P. Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre murcha-bacteriana do tomateiro. **Horticultura Brasileira**. v.23, n.1, p.05-08, 2005.
- BALBI-PEÑA, M.I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extrato de *Curcuma longa* e curcumina – I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.31, n.3, p.310-314, 2006a.
- BALBI-PEÑA, M.I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extrato de *Curcuma longa* e curcumina – I. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.31, n.4, p.401-404, 2006b.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, p.62-74, 1986.
- BOLETIM TÉCNICO ECOLIFE®₄₀. **Estimulando as plantas a produzir suas próprias defesas**. São José dos Campos: Quinabra. 19 p.
- BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSAMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo axtrato aquoso de *Eucalyptus citridora*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, n.2, p.128-133, 2004.
- BRINGEL, J.M.M. **Caracterização bioquímica, patogênica, e molecular de isolados de *Ralstonia Solanacearum* biovar 2 de batata e berinjela**. Tese de Doutorado, Piracicaba-SP, 2002.
- CAMARGO FILHO, W.P., MAZEI, A.R. Produção de tomate – sustentabilidade e preços. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.32, n.8, p.45-50, 2002.
- CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; RIBEIRO Jr., P.M.; COSTA, J.C.B.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, n.4, p.372-380, 2006.

CAVALCANTI, L.S & RESENDE, M.L.V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-*Verticillium* em cacauero. *Fitopatologia brasileira*. v.30, n.1, p.67-71, 2005.

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, 2005a, 263p.

CAVALCANTI, L.S; BRUNELII, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. 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, p.81-124, 2005b.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids: em LYR, H.; RUSSEL, P.E.; SISLER, H.D. (Ed.). **Modern Fungicides and Antifungal Compounds**. Andover: Intercept, p.461-466, 1996.

DI PIERO, R.M.; GARCIA Jr., D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. 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, p.29-50,2005.

DONG, H., WEIJIANG, L.; ZHANG, D.; TANG, W. Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against *Verticillium* wilt cotton. **Crop Protection**, v.22. p.129-134, 2003.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

GIORDANO, L.B.; SILVA, C. Hibridação em tomate. In: BOREM, A. (ed.) **Hibridação Artificial de Plantas**. Viçosa: UFV, p.462-480, 1999.

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

GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.

GRIMAUULT, V.; GÉLIE, B.; LEMATTRE, M.; PRIOR, P.; SCHMIT, J. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.44. p.105-123, 1994.

HACISALIHOGU, G.; JI, P.; LONGO, L.M.; OLSON, S.; MOMOL, T.M. Bacterial wilt induced changes in nutrient distribution and biomass and the effect of acibenzolar-S-methyl on bacterial wilt in tomato. **Crop Protection**, v.26, p.978-982, 2007.

HIJWEGWN, T., VERHAAR, M.A.; ZADORKS, J.C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, v.45, p.631-635, 1996.

JI, P.; MOMOL, M.T.; TOSUN, N. Alltech's 20th Annual Symposium. Kentucky. 2004.

JUNIOR, V.A.M. Doenças bacterianas em tomateiro: etiologia e controle. **Seminário de Atualização Cadeia Produtiva do Tomate, Mogi-Guaçu**, SP, 2004. Disponível em: <http://www.agr.unicamp.br/tomates/pdfs/doebacter.pdf>. Acessado em: 09/01/2005.

KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R.; DEL ÁGUILA, R.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina – Ciências Agrárias**, v.27, n.1, p.13-20, 2006.

KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Ed.) **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas**. Vol. 2. 3ª ed. Editora Ceres, São Paulo – SP. 2005, p.607-626.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA/ CNPH, 1994. 67 p.

MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Editora Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000.

MOMOL, J.P.; OLSON, S.M.; HONG, J.; PRADHANANG, P.; ANITH, K.N.; JONES, J.B. New tactics for bacterial wilt management on tomatoes in the southern. **Acta Horticulturae**. v.695, p.153-160, 2005.

MONMA, S.; SAKATA, Y. Inheritance of resistance to bacterial wilt in tomato. Bacterial Wilt. **ACIAR Proceedings** nº 45. Australia. 1992, p.149-153.

MOTOYAMA, M.M. *et al.* Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungotóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v.25, n.02, p.491-496, 2003^a.

MOTOYAMA, M.M. *et al.* Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v.25, n.02, p.509-512, 2003^b.

NETTO, R.A.C.; PEREIRA, B.G.; NODA, H.; BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. **Fitopatologia brasileira**, v.28, n.04, p.362-366, 2003.

OLIVEIRA, W.F. GIORDANO, L.B.; LOPES, C.A. Herança da resistência em tomateiro à murcha-bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**. v.24, n.1, p.49-53, 1999.

OOSHIRO, A.; TAKAESU, K.; NATSUME, M.; TABA, S.; NASU, K.; UEHARA, M.; MURAMOTO, Y. Identification and use of a wild plant with antimicrobial activity against *Ralstonia solanacearum* the cause of bacterial wilt of potato. **Weed Biology and Management**. v.4, p.187-194, 2004.

OSSWALD, W.F.; STANGARLIN, J.R.; NICHOLSON, R.L.; BRUMMER, M.; WULFF, N.A.; DI PIERO, R.M.; PICCININ, E.; DI CIERO, L.; HOTO, F.V.; PASCHOLATI, S.F. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**. v.30, n. 4, p.415-420, 2005.

PADMAVATI, M. et al. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, Oxford, v.46, n.3, p.499-502, 1997.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.(Ed.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995. v.1. cap. 22, p.417-454.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**. v.30, p.05-09, 2005.

PRADHANANG, P.M.; JI, P.; MOMOL, M.T.; OLSON, S.M.; MAYFIELD, J.L.; JONE, J.B. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. **Plant Disease**, v. 89, p. 989-993, 2005.

QUERINO, C.M.B.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R.S.B.; MATOS, A.P. Efeito de dois indutores de resistência sobre a severidade do mal-do-Panamá. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.3, p.239-243, 2005.

RODRIGUES, A.A.C.; NETO, E.B.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v31, n.5, p. 492-499, 2006.

ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Editora UFV, 1999. 45 p.

RUESS, W.; MULLER, K.; KNAUF-BEITER, G.; KUNZ, W.; STAUB, T. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. In: **CIBA'S Contribution**, CIBA, Basle, p.9-17, 1996.

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

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. 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, p.125-138, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**. v.8, p.554-556, 2003.

SILVA, A.A.O.; BACH, E.E. Indução de resistência em plantas de cevada contra *Bipolaris sorokiniana* utilizando extrato de gengibre. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo. v.71, p.111-114, 2004.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de Acibenzolar-S-Methyl na indução e resistência de feijoeiro comum à Murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, n.4, p.373-377, 2004.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.O.; 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, p.51-80, 2005.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.16-21, 1994.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas Mediciniais - Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano II, n.11, p.16-21, 1999.

STEVENS, C.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; KABWE, M.K.; HAUNG, Z.; ADEYEYE, O.; PUSEY, L.P.; TANG, A.Y.A. Induced resistance of sweetpotato to Fusarium root rot by UV-C hormesis. **Crop Protection**. v. 22, p.463-470, 1999.

TAKATSU, A. LOPES, C.A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**. v.15, p.170-177, 1997.