

**APLICAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METHIL
EM LARANJEIRA 'PERA' VISANDO
À PROTEÇÃO CONTRA *Xylella fastidiosa* WELLS**

MARCELO CALEGARI

1999

MARCELO CALEGARI

**APLICAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METHIL EM
LARANJEIRA 'PERA' VISANDO À PROTEÇÃO
CONTRA *Xylella fastidiosa* WELLS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador:

Prof. MOACIR PASQUAL

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

MARCELO CALEGARI

**APLICAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METHIL EM
LARANJEIRA 'PERA' VISANDO À PROTEÇÃO
CONTRA *Xylella fastidiosa* WELLS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 10 de setembro de 1999

Prof. José Darlan Ramos UFLA

Dr. Pedro Takao Yamamoto FUNDECTRUS



Prof. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

À minha esposa, Fernanda, pela
compreensão, orientação e ajuda.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e iluminar meu caminho.

A meus pais, Nelson e Maria Helena, meus irmãos, Andrea e Aroldo e demais familiares, especialmente Adir Carlos de Carvalho e família.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento de uma vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Moacir Pasqual, pela orientação e aos professores Nilton Nagib Jorge Chalfun e José Darlan Ramos.

Aos amigos Watson Rogério Azevedo, Vinícius Gonçalves de Freitas, Antônio Chalfun Júnior, Maximilian de Souza Gomes, Antônio Coutinho, Pedro Takao Yamamoto, Antônio Juliano Ayres e Roberto Moretzsohn de Castro.

Ao Fundo Paulista em Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) e à Novartis Biociências S.A. pela orientação e apoio no desenvolvimento dos trabalhos.

Às instituições: - Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro; - Instituto Biológico de São Paulo; - Estação Experimental do Instituto Biológico de Presidente Prudente. E às empresas agropecuárias: Sucocítrico Cutrale; Citrosantos Agropecuária; Agropecuária Cambuhy-Marchesan; Flórida Agrocitros; Fazenda Santa Maria (Nelson Calegari); Fazenda Rio Verde (Pedro Iannini); Fazenda São José (Vinícius Pimentel); Fazenda Santa Irene, pelo apoio na execução dos trabalhos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Clorose Variegada dos Citros	2
2.1.1 Sintomas	2
2.1.2 Agente Causal	3
2.1.3 Formas de disseminação	8
2.1.4 Métodos de detecção da bactéria	11
2.1.5 Manejo da CVC	12
2.2 Ativação de Resistência em Plantas	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Aspectos Gerais	20
3.2 Descrição dos ensaios	21
3.2.1 Efeito da aplicação de acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento das plantas de laranjeira 'Pera'	21
3.2.2 Efeito da aplicação de acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento de <i>X. fastidiosa</i> em plantas de laranjeira 'Pera'	22
3.3 Inoculação de <i>X. fastidiosa</i>	23
3.4 Características Avaliadas	25
3.4.1 Diâmetro e Altura	25
3.4.2 Detecção de <i>X. fastidiosa</i>	25
3.4.3 Proteção oferecida pela aplicação de acibenzolar-S-methyl contra <i>X. fastidiosa</i>	26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Efeito da aplicação de acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento das plantas de laranjeira ‘Pera’	27
4.2 Efeito da aplicação de acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento de <i>X. fastidiosa</i> em plantas de laranjeira ‘Pera’	31
4.2.1 Proteção oferecida pela aplicação de acibenzolar-S-methyl contra <i>X. fastidiosa</i>	33
5 CONCLUSÕES	37
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

CALEGARI, Marcelo. Aplicação de acibenzolar-S-methyl em laranjeira 'Pera' visando à proteção contra *Xylella fastidiosa* Wells. Lavras: UFLA, 1999. 43p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia)*

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do 'ativador de plantas' acibenzolar-S-methyl no desenvolvimento e na proteção de plantas de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] contra a bactéria causadora da Clorose Variegada dos Citros (CVC), *Xylella fastidiosa* Wells. Aplicações do ativador de plantas acibenzolar-S-methyl (CGA245704) foram feitas nas dosagens de 20 e 40g i.a./hl. Posteriormente, 3 e 6 dias após a primeira aplicação (DAT), fez-se a inoculação das plantas por meio de enxertia, com borbulhas provenientes de ramos com sintomas típicos de CVC. A aplicação do acibenzolar-S-methyl não interferiu no desenvolvimento das plantas de laranjeira 'Pera', inoculadas ou não. A proteção oferecida pelo CGA245704 pôde ser verificada treze meses após a inoculação, tendo sido medida através do teste de ELISA ('Enzyme linked immunosorbent assay'). Todos os tratamentos ofereceram proteção contra a *Xylella fastidiosa*, com as seguintes porcentagens: 67,46%; 69,81%; 81,18% e 89,48% com os tratamentos de 20g i.a./hl a 3 DAT, 20g i.a./hl a 6 DAT, 40g i.a./hl a 3 DAT, 40g i.a./hl a 6 DAT, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa entre as doses aplicadas, sendo que a dose de 40g i.a./hl demonstrou maior eficiência na redução do desenvolvimento da bactéria.

* Comitê Orientador: Moacir Pasqual - UFLA (Orientador),
José Darlan Ramos - UFLA.

ABSTRACT

CALEGARI, Marcelo. Application of acibenzolar-S-methyl in 'Pera' orange plants aiming to protect from *Xylella fastidiosa* Wells. Lavras: UFPA, 1999. 43p. (Dissertation - Master Program in Plant Science)*

The present work was designed to evaluate the effect of the application of the 'plant activator' acibenzolar-S-methyl in the development and protection of orange plants, of the 'Pera' variety [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] against the bacterium that causes the Citrus Variegated Chlorosis (CVC), *Xylella fastidiosa* Wells. Applications of the plant activator acibenzolar-S-methyl (CGA245704), were done at the dosages of 20 and 40g i.a./hl rates. Afterwards, three and six days after the first application (DAA), the plant inoculation was done by grafting, with buds coming from stem with typical CVC symptoms. The application of acibenzolar-S-methyl did not interfere in the 'Pera' citrus plants development, whether inoculated or not. The protection offered by CGA245704 could be checked thirteen months after the inoculation, its having being measured through the ELISA ('Enzyme linked immunosorbent assay') test. All treatments offered protection against the *Xylella fastidiosa* bacteria, with the followings percents: 66,46%, 69,81%, 81,18% and 89,48% with the 20g a.i./hl at 3 DAA, 20g a.i./hl at 6 DAA, 40g a.i./hl at 3 DAA, 40g a.i./hl at 6 DAA treatments, respectively. A significant statistically-difference could be observed among the applicated doses, the 40g a.i./hl being the one that showed more efficiency in reducing the bacterial development.

* Guidance Committee: Moacir Pasqual - UFPA (Major Professor),
José Darlan Ramos - UFPA.

1 INTRODUÇÃO

O correto manejo das pragas e doenças que afetam os citros é uma grande ferramenta na produção econômica e ecologicamente viável dessa cultura. Para não ter que amargar a difícil convivência com microorganismos indesejáveis, pesquisadores e agricultores vêm buscando novos produtos químicos para solucionar os problemas causados por esses patógenos, sendo que, na maioria das vezes, a solução chega com atraso.

Esse problema se agrava no Brasil, um país tropical, onde as condições climáticas são extremamente favoráveis ao desenvolvimento de doenças. Neste caso, pode-se citar a convivência com a Clorose Variegada dos Citros e a grande campanha para a erradicação do Cancro Cítrico, que visa a eliminar definitivamente a idéia de convívio com essa terrível ameaça à citricultura nacional.

Recentemente, com o surgimento de uma nova tecnologia de controle de doenças, baseada em compostos químicos que ativam os mecanismos de defesa da planta, dentre os quais pode-se citar o acibenzolar-S-methyl, um composto químico destinado à aplicação em larga escala, surge uma nova opção no controle às doenças que afetam as grandes culturas do país.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do 'ativador de plantas' acibenzolar-S-methyl, na proteção de plantas de laranjeira 'Pera', contra a bactéria *Xylella fastidiosa*, por meio de inoculação por enxertia, utilizando borbulhas provenientes de ramos afetados pela Clorose Variegada dos Citros.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Clorose Variegada dos Citros

Desde 1987 surgiu nos pomares do município de Colina - S.P., no Triângulo Mineiro e nas regiões Norte e Noroeste do Estado de São Paulo (De Negri, 1990), a Clorose Variegada dos Citros, mais conhecida como CVC ou “amarelinho”, a qual vem causando grandes prejuízos à citricultura nacional.

De rápida disseminação, a CVC se alastrou por todo o território nacional durante um curto período de tempo. Segundo Tubelis et al. (1993), em apenas cinco anos (1987 a 1993) a CVC já se encontrava em 134 municípios paulistas, seis municípios em Minas Gerais, quatro no Rio de Janeiro, três no Paraná, um no Rio Grande do Sul, dois em Goiás e um no Distrito Federal. E em 1995, em levantamento feito pelo Fundecitrus, 26% das plantas cítricas do Estado de São Paulo apresentam algum sintoma de CVC (Salva et al., 1995).

Todas as variedades comerciais de laranja cultivadas no Brasil são atacadas pela CVC (Pera, Natal, Hamlin, Valência, Baianinha, Folha Murcha, etc.) e sobre diferentes porta-enxertos (limão Cravo, Trifoliata, tangerina Cleópatra e Sunki, laranja Caipira, etc.). Os sintomas não têm sido encontrados no tangor Murcote, na lima ácida Galego, nos limões verdadeiros (Siciliano e Eureka) e nas tangerineiras comerciais (Cravo e Poncan) (Li, 1997). A doença é mais severa em plantas jovens, sendo que a severidade diminui após 8 - 10 anos do plantio (De Negri, 1990).

2.1.1 Sintomas

Os sintomas típicos de CVC são:

- clorose das folhas, inicialmente na parte mediana e superior da copa, alastrando-se posteriormente por toda a planta;

- as folhas apresentam sintomas de deficiência nutricional, normalmente de zinco, boro e potássio (frutos miúdos);
- as manchas cloróticas da face ventral correspondem a pequenas bolhas de goma cor de palha na face dorsal, semelhantes a manchas devidas à toxicidade de boro (Figura 1);
- frutos de tamanho reduzido, endurecidos, persistentes e com amarelecimento precoce, que se tornam imprestáveis para a comercialização (Figura 2);
- as plantas muito afetadas apresentam galhos salientes na parte superior da copa, com folhas e frutos miúdos e desfolha nos galhos do ponteiro (Rossetti e De Negri, 1990a; De Negri, 1990; Malavolta et al., 1990) (Figura 3).

Malavolta et al. (1990) afirmaram que os sintomas são muito semelhantes aos causados por deficiência de zinco. Vitti et al. (1989) encontraram semelhanças com os sintomas de deficiência de zinco e boro.

Os frutos de ramos contaminados apresentam uma redução a um terço a um quarto do tamanho quando comparados com frutos provenientes de ramos sadios da mesma florada (Malavolta et al., 1990)(Figura 4).

2.1.2 Agente Causal

Rossetti et al. (1990b) publicaram os primeiros resultados, mostrando por microfotografias, por microscópio eletrônico, os vasos xilemáticos de plantas doentes inteiramente tomados por uma bactéria semelhante à *Xylella*.

A confirmação de que o agente causal da CVC era *Xylella fastidiosa* Wells foi obtida quando se conseguiu a inoculação e o reisolamento da bactéria (fechamento do postulado de Koch) por Chang et al.(1993) e Beretta et al. (1993). Desta forma ficou provado que os problemas nutricionais que aparecem na sintomatologia eram consequência e não a causa da CVC.

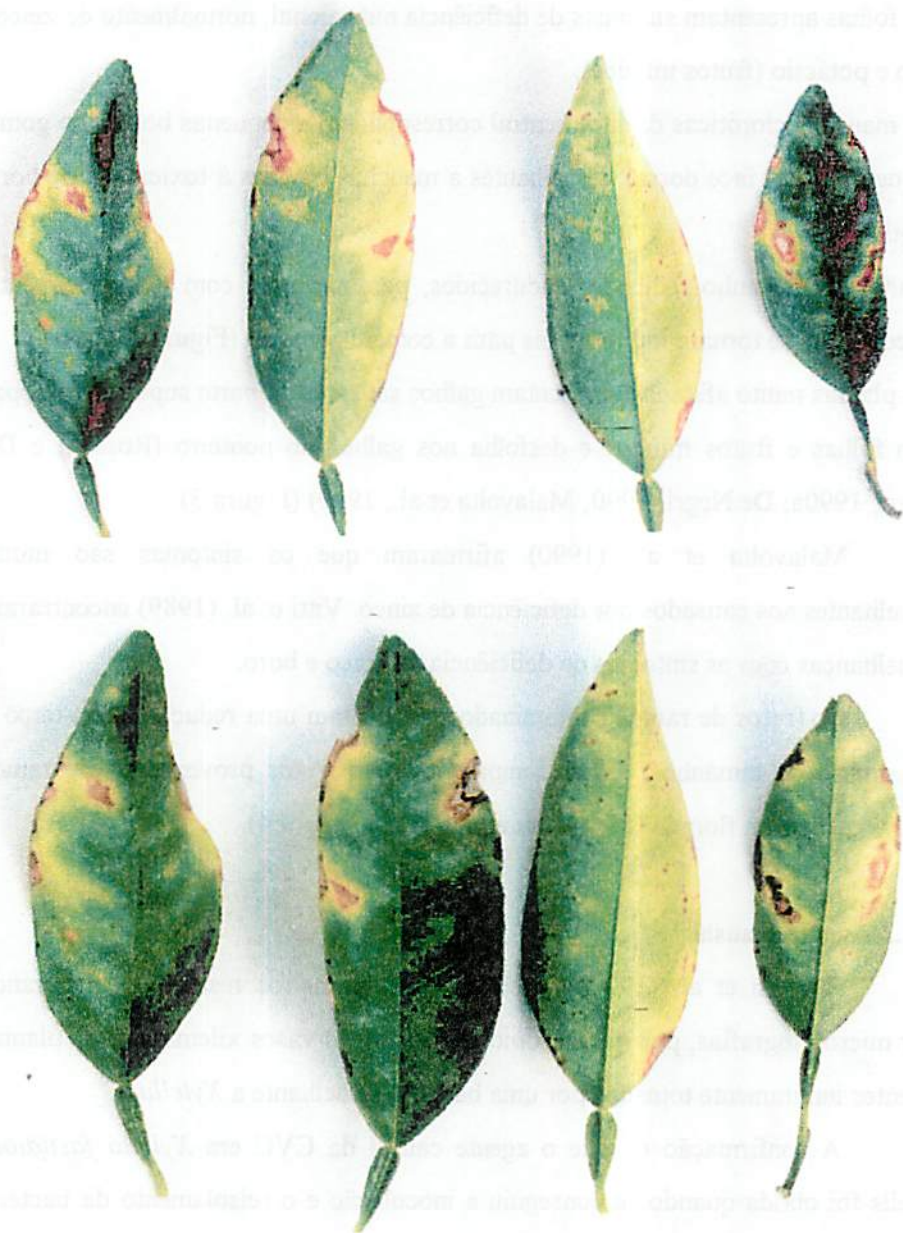


FIGURA 1 Manchas cloróticas da face ventral que correspondem a bolhas de goma cor de palha da face dorsal. UFLA, Lavras - MG, 1999.



FIGURA 2 Frutos persistentes, imprestáveis para a comercialização. UFLA, Lavras - MG, 1999.



FIGURA 3. Galhos salientes na copa, folhas e frutos miúdos e desfolha dos ponteiros das plantas. UFPA, Lavras - MG, 1999.



FIGURA 4. Frutos de tamanho reduzido provenientes de ramos afetados pela CVC, comparados com frutos de ramos saudáveis. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Durante esse período em que pouco se sabia sobre a nova anomalia que afetava a citricultura brasileira, várias hipóteses sobre sua causa foram propostas, tais como: toxidez por excesso da aplicação de herbicidas, desequilíbrios nutricionais causando condições favoráveis ao patógeno, deficiências de zinco e de potássio (Vitti et al., 1989; Malavolta et al., 1992; Malavolta e Prates, 1991).

2.1.3 Formas de disseminação

As primeiras indicações das formas de transmissão da *X. fastidiosa* foram feitas por Rossetti et al. (1993), quando foram plantadas mudas protegidas e não com uma tela contra insetos em áreas de alta incidência da doença e as plantas protegidas não apresentaram sintomas da doença.

Logo começaram os estudos dos vetores da CVC. Nas plantas afetadas encontraram as cigarrinhas da família Cicadellidae (De Negri e Garcia Jr., 1993). Da subfamília Cicadellinae mais de dezenove espécies foram constatadas em citros. Dentre as espécies que são comprovadamente vetores da *X. fastidiosa* estão a *Acrogonia terminalis* (Figura 5a), *Oncometopia facialis* (Figura 5b), *Dilobopterus costalimai* (Figura 5c), *Plesiommata corniculata* (Figura 5d) e *Bucephalagonia xanthophis* (Figura 5e) (Yamamoto e Roberto, 1997; Krugner, 1998). Elas transmitem *X. fastidiosa* em plantas sadias, após sua aquisição, que ocorre durante a alimentação em plantas doentes (Lopes et al., 1996; Roberto et al., 1996).

Além das espécies de cigarrinhas citadas anteriormente, existem as que são classificadas como vetores em potencial e ainda estão sendo estudadas: *Homalodisca ignorata* (Figura 5f), *Macugonalia cavifrons* (Figura 6a), *Macugonalia leucomelas* (Figura 6b), *Hortensia similis* (Figura 6c), *Ferrariana*



a) *Acrogonia terminalis*



b) *Oncometopia facialis*



c) *Dilobopterus costalimai*



d) *Plesiommata corniculata*

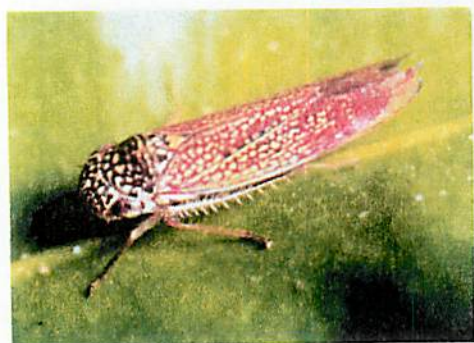


e) *Bucephalagonia xanthophis*



f) *Homalodisca ignorata*

FIGURA 5. Espécies de cigarrinhas vetoras da *Xylella fastidiosa* (a, b, c, d, e) e espécie potencialmente vetora (f). UFLA, Lavras – MG, 1999.



a) *Macugonalia cavifrons*



b) *Macugonalia leucomelas*



c) *Hortensia similis*



d) *Ferrariana trivittata*



e) *Sonesimia grossa*



f) *Molomea cincta*

FIGURA 6. Espécies de cigarrinhas potencialmente vetoras de *Xylella fastidiosa*.
UFLA, Lavras - MG, 1999.

trivittata (Figura 6d), *Sonesimia grossa* (Figura 6e) e *Molomea cincta* (Figura 6e) (Gravena et al., 1997b).

X. fastidiosa também é transmitida pelo processo da enxertia. A bactéria é transmitida de porta-enxerto contaminado para o enxerto sadio, e de borbulhas contaminadas para o porta-enxerto (Sempionato et al., 1997).

2.1.4 Métodos de detecção da bactéria

Os sintomas da Clorose Variegada dos Citros estão relacionados ao entupimento dos vasos do xilema causados pela *X. fastidiosa*. Essa característica peculiar da doença faz com que o desenvolvimento dos sintomas de CVC nas plantas tenha grande dependência dos fatores climáticos aos quais elas estão submetidas.

Para que o processo de detecção da bactéria na planta seja mais rápido, existem diversos métodos de diagnóstico. Dentre eles pode-se citar a identificação da bactéria pela microscopia eletrônica de transmissão (Rossetti, et al., 1990b; Chagas et al., 1992), microscopia - imunofluorescência (Brlansky et al., 1993), microscópio ótico (Lima et al., 1994), os testes imunoenzimáticos ELISA ('Enzyme linked immunosorbent assay') e DIBA ('Dot immuno-binding assay') (Garnier et al., 1993; Harakava e Beretta, 1994) e os testes moleculares, que se baseiam na amplificação exponencial de fragmentos de DNA, usando a enzima DNA polimerase e um par de 'primers' específicos para *X. fastidiosa* e sua detecção através da eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Minsavage et al., 1994; Pooler e Hartung, 1995; Beretta et al., 1997; Lemos et al., 1997).

2.1.5 Manejo da CVC

As formas de manejo da CVC estão resumidas em três pontos:

- plantio de mudas sadias (Sempionato et al., 1997). Mudas isentas de *X. fastidiosa* crescerão plantas sadias e produtivas, ao passo que mudas contaminadas só trarão prejuízos para o agricultor. Isto torna a aquisição e acompanhamento da formação das mudas uma tarefa de fundamental importância para o futuro sucesso do citricultor;

- poda dos ramos com sintomas da doença (Carlos et al., 1997). Deve ser ressaltado que plantas abaixo de dois anos que apresentem sintomas de CVC deverão ser erradicadas;

- controle dos insetos vetores de *X. fastidiosa* (cigarrinhas) (Gravena et al., 1997a). Utilizando sempre o Manejo Integrado de Pragas e Doenças, para se evitar o uso indiscriminado de inseticidas e acaricidas, os quais podem causar um grande desequilíbrio ecológico se utilizados de maneira inadequada.

Todas as medidas de manejo da CVC estão apoiadas na não introdução de plantas contaminadas no pomar e controle de insetos vetores de *X. fastidiosa*. Para a obtenção de enxertos isentos dessa bactéria, algumas metodologias, tais como tratamento de borbulhas com antibióticos e termoterapia, estão sendo testadas. Contudo, para plantas sobre condições de campo não foi encontrada, ainda, metodologia e/ou produto de eficiência comprovada com ação direta sobre *X. fastidiosa*.

2.2 Ativação de Resistência em Plantas

Sabe-se que as plantas têm a capacidade de desenvolver resistência após infecção secundária. Em 1933 K. Chester escreveu que "imunidade em plantas... pode representar um papel importante na sua preservação na natureza". Algumas décadas depois, Frank A. Ross conduziu alguns experimentos clássicos com

tabaco (Ross, 1961), em que Resistência Sistêmica Ativada/Adquirida (SAR) pode ser ativada através de infecções locais, como, por exemplo, com vírus de mosaico de tabaco (TMV). Essa resistência não foi limitada apenas ao local da infecção, mas se espalhou por toda a planta.

Alguns anos depois, J. Kuc, Professor da Universidade de Kentucky, outro pioneiro sobre SAR, mostrou que plantas de pepino apresentaram resistência a patógenos alguns dias após uma infecção localizada com certos vírus, bactérias ou fungos. Ele mostrou que as plantas de pepino não apenas são resistentes ao fungo *Colletotrichum lagenarium*, mas também contra uma ampla variedade de outras doenças, inclusive fungos, bactérias e vírus. Uma pré-infecção local, como por exemplo, com o vírus da necrose do tabaco, protege pepino contra pelo menos treze doenças (Madamanchi e Kuc, 1991). Corroborando as experiências, Kessmann et al. (1994) demonstraram desenvolvimento de resposta em SAR em tabaco, ervilha, algodão, batata, soja, tomate, alfaça, cevada, trigo, arroz e *Arabidopsis thaliana*.

Para descrever os mecanismos de SAR, pode-se dizer que as plantas freqüentemente respondem, no local da tentativa de infecção microbiana, à morte localizada da célula (resposta hipersensível). Segue-se, assim, uma série de respostas adicionais de defesa, inclusive a formação de metabólitos antimicrobiais (fitoalexinas), formação de calose, lignificação e ligamento das paredes celulares (Kombrink e Somssich, 1995). Esses mecanismos são estritamente localizados e não são induzidos durante a resposta de SAR. Porém, se uma planta pré-infectada (imunizada) é atacada por um patógeno, ela freqüentemente responde com maior rapidez utilizando esses mecanismos (efeito primário).

Em tabaco, pepino e algumas espécies de dicotiledôneas, estudos bioquímicos mostraram que a resposta de SAR está relacionada com o acúmulo

de certas proteínas relacionadas aos patógenos (proteínas PR). Estas proteínas PR acumulam-se predominantemente entre as células, isto é, somente nas áreas onde os micróbios patogênicos tendem a crescer antes do ataque às células.

Algumas das proteínas PR foram caracterizadas, como β -1,3 glucanases e chitinases, enzimas capazes de degradar as paredes celulares de fungos e bactérias. Essa atividade enzimática, também estudada em plantas transgênicas, faz com que seja muito provável sua importância no papel do desenvolvimento de SAR. Porém, outros mecanismos, como o de efeito primário, também são importantes, e ainda é incerta a importância relativa que esses mecanismos de defesa possam ter na resposta de SAR (Kessmann et al., 1994).

Em 1979, Ray White mostrou que a aplicação exógena de ácido salicílico (AS) ou Aspirina resulta no acúmulo de Proteínas PR e proteção ao tabaco contra TMV. Esses dados mostraram que realmente é possível induzir SAR através de moléculas simples. Porém, a quantidade de ácido salicílico requerida para controle eficiente de doença é bastante alta, provavelmente isto se deve à sua rápida degradação na planta.

Em 1990, vários laboratórios descobriram que as plantas acumulavam ácido salicílico depois de indução de SAR por uma infecção local com patógenos (Malamy et al., 1990, Metraux et al., 1990). Foi quando surgiu a seguinte questão: “o ácido salicílico é o ativador endógeno natural das plantas?” Para se estudar o papel do ácido salicílico endógeno em tabaco, foram criadas plantas transgênicas incapazes de acumular ácido salicílico (Gaffney et al., 1993). Não foi possível induzir SAR nessas plantas. Com esse fato, houve um forte indício de que o ácido salicílico é de fato uma importante molécula de sinalização na indução de SAR.

A princípio, o sistema de SAR apresenta algumas características interessantes para o controle de doenças de plantas na prática agrícola e por

aumentar nosso conhecimento básico sobre resistência de doenças em plantas. Primeiro, a resistência a doenças, que é o resultado da resposta de SAR, é um fenômeno de defesa natural. Segundo, o modelo biológico de SAR em pepino e tabaco demonstrou que SAR pode conduzir, por um longo período, o controle de um amplo espectro de doenças. Além disso, há ampla evidência de que SAR está baseado em mecanismos múltiplos de defesa que fazem com que possa haver uma redução na probabilidade do desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos a esse sistema.

SAR pode ser induzido por microorganismos, extratos microbianos ou substâncias químicas específicas. O uso, na prática, de microorganismos necrogênicos para indução de SAR pode ser possível, mas é restrito a pequenos grupos de cultivares e em pequena escala. Porém, nenhum produto foi apresentado para o mercado com esse modo de ação.

Substâncias químicas de baixo peso molecular capazes de induzir SAR têm um grande potencial no controle de doença de grandes culturas. Esses ativadores de plantas devem obedecer a três critérios:

- as plantas tratadas são tão resistentes ao mesmo espectro de patógenos quanto as das plantas ativadas naturalmente;
- os compostos e seus metabólitos não exibirem nenhuma atividade antimicrobiana direta;
- eles devem induzir os mesmos processos bioquímicos na planta que são característicos para tecidos de planta após ativação sistêmica natural.

Além do ácido salicílico, têm-se como ativadores de plantas as primeiras combinações que apresentam boa atividade para ativação de SAR em grandes culturas, o ácido 2,6-dichloroisonicotínico (CGA 41396, INA) e acibenzolar-S-methyl (CGA 245704, BTH) (Figura 7).

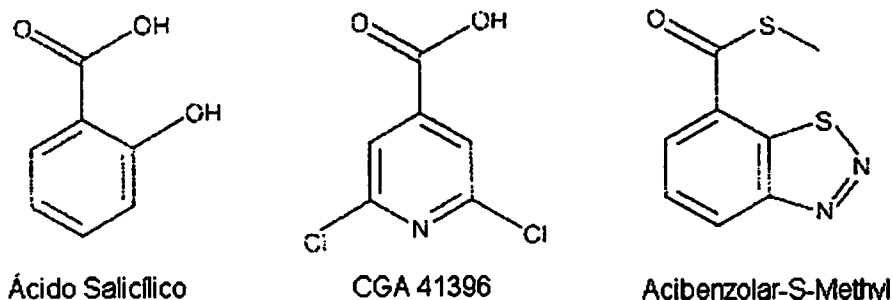


FIGURA 7 Ativadores de plantas conhecidos. UFLA, Lavras - MG, 1999.

O acibenzolar-S-methyl é um bom exemplo de um ativador de plantas e completa todos os critérios citados anteriormente. Já existem várias pesquisas para aplicação comercial em muitos países e já é comercializado no mercado da Alemanha e Suíça.

Tem sido mostrado com detalhes que acibenzolar-S-methyl, assim como outros ativadores, causa as mesmas mudanças bioquímicas na planta, como uma ativação biológica (Ward et al., 1991; Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996). A ilustração da Figura 8 mostra como se inicia a ativação biológica com uma infecção localizada. Uma molécula sinalizadora é formada e transportada por toda a planta causando o acúmulo de ácido salicílico por toda a planta e leva a resposta de SAR. O Ativador de Plantas CGA245704 induz SAR, imitando a função do ácido salicílico. O composto não tem qualquer atividade direta contra os microorganismos patogênicos. Um critério muito importante é o espectro de atividade: o CGA 245704 protege pepino contra o fungo *Colletotrichum lagenarium*, a bactéria *Pseudomonas lachrymans* e o vírus TNV. O mesmo espectro de atividade é observado depois de ativação biológica com uma infecção de TNV localizada.

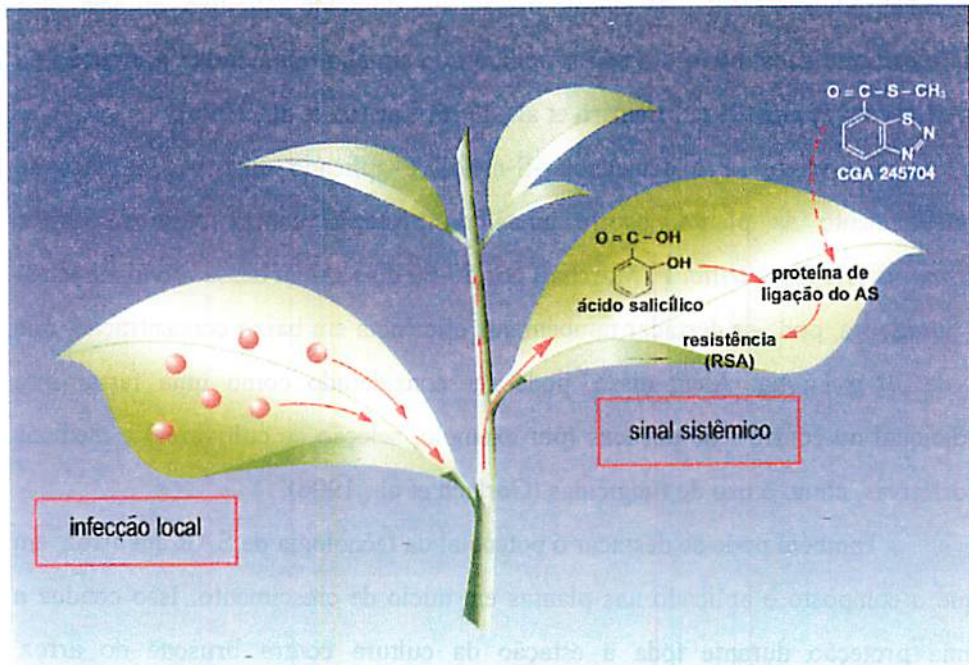


FIGURA 8 Modo de ação dos Ativadores de Plantas. UFLA, Lavras – MG, 1999.

Além disso, um mutante de *Arabidopsis thaliana*, uma erva e sistema de modelo para biologia molecular, foi descoberto recentemente que não pode ser ativado através de ativadores biológicos ou químicos (= non-inducible ou “mutantes nim”; Lawton et al., 1996). Nessas plantas, o ácido salicílico, CGA 245704 e CGA 41396 são inativos. O fato de que a mutação está em um único gene recessivo e que diferentes ativadores (inclusive biológicos) são inativos, indicam que a não-inducibilidade não está ligada a uma mudança no metabolismo da planta.

Estudos detalhados mostraram que os ativadores de plantas como o INA ou BTH induzem SAR pelo mesmo mecanismo do ácido salicílico, ou seja, eles simplesmente substituem o ácido salicílico no caminho que conduz a indução de SAR (Ward et al., 1991; Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996).

Em trigo, se o acibenzolar-S-methyl é aplicado uma vez na fase de perfilhamento da planta, ocorre uma boa proteção contra oídio (*Erysiphe graminis* Dc. f. sp. *tritici* F. Marchal) por 50-60 dias. Além dessa atividade longa e duradoura, pode-se destacar também sua eficiência em baixa concentração, que é de 30 g i.a./ha. Além disso, pode ser considerado como uma ferramenta adicional no controle de doenças (por exemplo, seleção de cultivares) e medidas corretivas, como o uso de fungicidas (Gorlach et al., 1996).

Também pode-se destacar o potencial da tecnologia de SAR em arroz, em que o composto é aplicado nas plantas em início de crescimento. Isso conduz a uma proteção durante toda a estação da cultura contra brusone do arroz, *Pyricularia oryzae* Cav., superior àquelas oferecidas pelos fungicidas atuais (Kessmann et al., 1994).

Para tabaco, o uso em concentrações extremamente baixas (12,5-35 g i.a./ha), oferece boa proteção contra o mofo azul (mildio) do tabaco, *Peronospora tabacina* Adam (Friedrich et al., 1996).

Em tomate, a aplicação de acibenzolar-S-methyl, além de conferir proteção à Mancha Bacteriana *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Pinta Preta [*Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout] e mofo das folhas (*Fulvia fulva*) também reduziu a incidência de larvas do minador (*Liriomyza* spp.), com maior destaque na fase mais jovem da planta. Com ensaio de chance de escolha, conduzido em laboratório, o efeito anti-herbívoro do acibenzolar-S-methyl foi confirmado quando os adultos de minadoras deram preferência a

plantas não ativadas pelo acibenzolar-S-methyl, como hospedeiras para a oviposição (Inbar et al., 1998).

A ativação de plantas de cacau pelo acibenzolar-S-methyl conferiu proteção contra a 'Vassoura-de-Bruxa' [*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer], reduzindo a doença em 61,18% na dosagem de 10 g i.a./hl aplicada sete dias antes da inoculação (Aguilar et al., 1998).

Contra a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.), o acibenzolar-S-methyl conferiu proteção sistêmica significativa (acima de 95%) às plantas de café, sendo que o efeito protetor persistiu por até dez semanas (Martins et al., 1998).

Trabalhando com frutos de laranja 'Valência', Fajardo et al. (1998) induziram, através de ativadores biológicos, com tratamento pós-colheita, à proteção dos frutos contra bolores (*Penicillium digitatum* Sacc.), tendo sido constatado atraso na instalação e no progresso da doença dos frutos ativados por esse processo.

O fato é que SAR está baseado em mecanismos múltiplos de defesa, o que implica em ter um baixo risco de desenvolvimento de raças de patógenos insensíveis para a defesa de SAR. Isto pode ajudar na proteção de maneira geral das plantas no campo. Implica ainda em uso racional dos defensivos agrícolas e maior durabilidade da vida de variedades resistentes, visto que a seleção de raças virulentas pode ser adiada.

No caso dos citros, a possibilidade de se utilizar um indutor de resistência para ativação das plantas contra as diversas doenças que afetam a citricultura mundial, surge como uma ferramenta de grande valor no auxílio aos produtores, pois até hoje convive-se com diversas formas de patógeno em que o controle é

feito por formas de prevenção ou, em casos mais extremos, pela erradicação das plantas afetadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS


3.1 Aspectos Gerais

Para a condução dos ensaios foram utilizadas mudas de laranjeira 'Pera' IAC-05, de haste única, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, enxertadas sobre Limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), provenientes de viveiro telado e certificado.

As mudas foram transportadas para duas localidades diferentes, no município de Araraquara, com a finalidade de estudar o efeito do Ativador de Plantas acibenzolar-S-methyl no desenvolvimento de *X. fastidiosa*; e para Taiúva, com o objetivo de se estudar a influência do acibenzolar-S-methyl no desenvolvimento das laranjeiras 'Pera'.

Já no local de instalação dos ensaios as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (diâmetro: 30 cm na parte superior e 22 cm na inferior; altura: 27 cm) com substrato de terra areno-argilosa [65% de terra areno-argilosa, 20% esterco bovino, 10% vermiculita, 3% orgânico humificado, 1% superfosfato simples, 0,5% calcário dolomítico e 0,5% NPK (12-06-12)].

O produto utilizado para ativação das mudas cítricas tem, como nome químico, éster S-metil do ácido benzo[1,2,3]tiadiazol-7 carbotióico; como nome comum, acibenzolar-S-methyl (proposto ISO) e, como código, CGA 245704. Sua formulação é do tipo grânulos dispersíveis em água, contendo 500 g de princípio ativo por quilograma de produto comercial (50WG Water-dispersible Granules). Esta molécula foi descoberta pela Ciba-Geigy, sendo atualmente comercializada pela Novartis AG (empresa resultante da fusão entre Ciba-Geigy e Sandoz), Suíça.



O esquema do quadro de análise de variância, com o esquema fatorial e a testemunha, estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Esquema de análise de variância para o delineamento inteiramente casualizado. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Tratamentos	2
Erro	27

3.2.2 Efeito da aplicação de acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento de *X. fastidiosa* em plantas de laranjeira 'Pera'

Com o objetivo de estudar a influência do ativador de plantas acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento da bactéria causadora da CVC, *X. fastidiosa*, foi conduzido um ensaio no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, mais uma testemunha (tratamento adicional), com 10 repetições, sendo cada planta uma repetição. Os fatores testados foram 2 concentrações de CGA245704 50WG (20 e 40g i.a./hl) e 2 épocas de enxertia (6 e 3 dias após a 1ª. aplicação do produto) e o tratamento adicional foi a testemunha, sem a aplicação do produto.

O modelo estatístico empregado, considerando-se o esquema fatorial 2x2, foi:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} : valor observado na i -ésima concentração de CGA245704 50WG, na j -ésima época de enxertia e na k -ésima repetição;

μ : média geral;

a_i : efeito do i -ésima concentração de CGA245704 50WG;

b_j : efeito da j -ésima época de enxertia;

ab_{ij} : efeito da interação da i -ésima concentração de CGA245704 50WG com a da j -ésima época de enxertia;

e_{ijk} : erro experimental; $e_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$

O esquema da análise de variância, com o esquema fatorial e a testemunha, está apresentado na Tabela 2.

TABELA 2. Esquema de análise de variância para o esquema fatorial 2x2 com tratamento adicional. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Concentração (C)	1
Épocas de Enxertia (E)	1
C x E	1
Adicional vs Fatorial	1
Erro	45

3.3 Inoculação de *X. fastidiosa*

Fez-se a transmissão de *X. fastidiosa* seguindo a metodologia desenvolvida por Wenbin Li (1997), oportunidade em que se fez a enxertia com

borbulhas, de 7cm ('borbulhões'), provenientes de ramos com sintomas característicos de CVC (Figura 9), retirados de plantas de laranjeira 'Pera' enxertada sobre limoeiro 'Cravo', da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, SP.



FIGURA 9. Enxerto por encostia feito com 'borbulhão', proveniente de ramos com sintomas de CVC, para transmissão de *X. fastidiosa*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

As plantas selecionadas foram cepadas e os ramos de ± 1 ano de idade apresentavam sintomas típicos da doença nas folhas. O uso de 'borbulhão' no lugar de borbulhas de tamanho convencional (± 1 cm), foi utilizado para garantir a

presença de bactérias em número suficiente para que ocorresse a contaminação das plantas em estudo. Essa metodologia foi utilizada para superestimar o número de bactérias a serem inoculadas nas plantas e ter a garantia de contaminação das plantas em estudo.

O processo de enxertia foi executado com três e seis dias após a primeira aplicação do acibenzolar-S-methyl.

3.4 Características avaliadas

3.4.1 Diâmetro e Altura

Durante a condução do ensaio, foram coletados, nos dias 20 de janeiro, 06 de março, 20 de abril, 04 de maio, 01 de junho, 26 de junho e 10 de julho de 1998, os dados sobre a altura das plantas e o diâmetro do tronco, a uma altura de 02 cm acima do ponto de enxertia. Essa avaliação objetivou verificar a influência da aplicação do acibenzolar-S-methyl quanto ao desenvolvimento das plantas de laranjeira 'Pera', e prováveis sintomas de fitotoxidez com as dosagens aplicadas.

3.4.2 Detecção de *X. fastidiosa*

Para detectar com maior rapidez a presença de *X. fastidiosa* nas mudas de laranjeira 'Pera', foi utilizado o teste de ELISA ('Enzyme linked immunosorbent assay'), realizado no laboratório do Fundo Paulista de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS em Araraquara - S.P..

Retiraram-se de cada parcela 05 folhas, ao redor de toda a planta, como amostra para o teste de ELISA no dia 05 de abril de 1999. Em seguida os extratos foram processados, utilizando o pecíolo e a nervura das folhas, cortadas e trituradas em Politron em 3 ml de tampão PBS. Em seguida os extratos foram filtrados em gase e alicotados em tubos ependorf, pronto para a leitura da

densidade ótica a 405 nm das placas no aparelho EIA READER, Model 3076 Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, U.S.

O ensaio ELISA foi do tipo sanduiche de duplo anticorpo (double-antibody sandwich, DAS) utilizando-se anticorpos simples e conjugados com fosfatase alcalina produzidos contra a bactéria *X. fastidiosa* isoladas de citros com Amarelinho, no Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, VillenavedOrmon, França).

3.4.3 Proteção oferecida pela aplicação de acibenzolar-S-methyl contra *X. fastidiosa*

A proteção decorrente dos ativadores de plantas é calculada pela diferença entre a lesão causada pelo patógeno nas plantas não ativadas e a lesão causada pelo mesmo nas plantas ativadas.

Em relação à CVC, como os sintomas da doença são causados pelo entupimento dos vasos xilemáticos pela *X. fastidiosa*, o cálculo da proteção conferida pelo acibenzolar-S-methyl contra a bactéria pode ser calculado pela diferença da densidade ótica a 405nm do teste de ELISA, que determina a quantidade de bactéria presente na amostra (Lima et al., 1997), das plantas não - tratadas e tratadas pelo acibenzolar-S-methyl.

Para que se possa calcular a proteção (P) conferida às plantas cítricas, pelo acibenzolar-S-methyl, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$P = \frac{\text{Densidade Ótica da Testemunha} - \text{Densidade Ótica do Tratamento}}{\text{Densidade Ótica da Testemunha}} \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da aplicação de acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento de plantas de laranjeira 'Pera'

Os resultados das análises de variância, para o delineamento inteiramente casualizado da medida do diâmetro e da altura, das plantas que não sofreram inoculação de *X. fastidiosa*, são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Análise de variância referente ao diâmetro (mm) e à altura (cm) das plantas ativadas pelo acibenzolar-S-methyl. UFLA, Lavras - MG, 1999.

FV	GL	QM	QM
		Diâmetro	altura
Tratamento	2	1,39600 ^{n.s.}	235,60000 ^{n.s.}
Erro	27	0,89744	141,33333
CV(%)		5,44	10,96

n.s. não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

As mudas de laranjeira 'Pera' que não foram inoculadas por meio da enxertia de borbulhas provenientes de ramos contaminados com *X. fastidiosa* (ensaio conduzido no município de Taiúva), não tiveram seu desenvolvimento prejudicado pela aplicação de acibenzolar-S-methyl, tanto na dosagem de 20 como na de 40g ia/hl. Descarta-se, assim, a possibilidade da interferência do ativador de plantas no desenvolvimento das plantas de laranjeira 'Pera'.

Na Tabela 4, são apresentadas as médias do diâmetro e da altura das plantas de laranjeira 'Pera' ativadas pelo acibenzolar-S-methyl.

TABELA 4. Média do diâmetro (mm) e da altura (cm) das plantas de laranjeira 'Pera' ativadas pelo ativador de plantas acibenzolar-S-methyl. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Tratamentos	Diâmetro (mm)	Altura (cm)
Testemunha	17,77	113,80
20g ia/hl	17,49	107,00
40g ia/hl	17,03	104,40

Para as plantas inoculadas por meio da enxertia de borbulhas provenientes de ramos contaminados com *X. fastidiosa*, os resultados das análises de variância, para o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 com tratamento adicional para as medidas do diâmetro e da altura, estão representados na Tabela 5.

Pelos resultados da análise de variância, pode-se constatar que houve diferença significativa entre as médias de altura das plantas quanto às diferentes concentrações de CGA245704 50WG e ainda nas diferentes épocas de enxertia; contudo, não houve diferença entre as plantas que sofreram aplicação de acibenzolar-S-methyl e as da testemunha (Fatorial vs. Adicional). A seguir, estão apresentadas as médias das alturas para as diferentes concentrações e diferentes épocas de enxertia (Tabela 6).

TABELA 5. Análise de variância referente ao diâmetro (mm) e à altura (cm) das plantas ativadas pelo acibenzolar-S-methyl e, posteriormente, inoculadas com *X. fastidiosa*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

FV	GL	QM	QM
		Diâmetro	altura
Concentração (C)	1	9,50625 ^{n.s.}	1050,62500*
Época de Enxertia (E)	1	8,19025 ^{n.s.}	748,225000*
C x E	1	0,30625 ^{n.s.}	1,22500 ^{n.s.}
Adicional vs. Fatorial	1	0,02645 ^{n.s.}	772,64 ^{n.s.}
Erro	45	2,495711	144,7089
CV(%)		12,79	15,02

n.s. não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 6 Médias das alturas (cm) relacionadas à dosagem de acibenzolar-S-methyl e com a época de enxertia com borbulhas provenientes de ramos infestados com *X. fastidiosa*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Doses	Altura (cm)	Épocas de Enxertia	Altura (cm)
Testemunha	87,90	Testemunha	87,90
20g ia/hl	84,40	6 DAT	93,85
40g ia/hl	94,65	3 DAT	85,20

DAT: dias após o tratamento

Comparando-se os tratamentos com a testemunha (Fatorial vs. Adicional), nota-se que não há diferença significativa em relação à altura das plantas (Tabela 5). Com isso, pode-se afirmar que, estatisticamente, as plantas tratadas comportaram-se igualmente como as que não receberam tratamento algum. Assim, conclui-se que o CGA245704 50WG não tem influência no desenvolvimento, no que diz respeito à altura, resultado este semelhante ao do ensaio em que as plantas não sofreram inoculação.

Do mesmo modo, observando-se a análise de variância para o diâmetro da planta (Tabela 5), verifica-se que não houve diferença nas diferentes concentrações de CGA245704 50WG e também para as diferentes épocas de enxertia. Estão apresentadas, a seguir, as médias dos diâmetros para as diferentes concentrações e diferentes épocas de enxertia (Tabela 7).

TABELA 7. Média do diâmetro (mm) das mudas de laranjeira 'Pera' ativadas pelo ativador de plantas acibenzolar-S-methyl e inoculadas por borbulhas contaminadas com *X. fastidiosa*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Doses	Diâmetro (mm)	Épocas de Enxertia	Diâmetro (mm)
Testemunha	13,86	Testemunha	13,86
20g ia/hl	13,32	6 DAT	14,26
40g ia/hl	14,29	3 DAT	13,35

DAT : Dias Após Tratamento.

A aplicação de acibenzolar-S-methyl em plantas de laranjeira 'Pera', nas dosagens e nos intervalos testados, não apresentou influência no desenvolvimento das mesmas, tornando viável sua utilização em larga escala.

Analisando os resultados, pode-se afirmar que o produto não apresentou efeito fitotóxico, nas dosagens citadas, pois os primeiros compostos sintéticos a apresentarem atividade de RSA, o Ácido Salicílico (AS) e o Ácido 2,6-dicloroisonicotínico e seu éster de metil (INA) (Vernooij et al., 1995), apresentaram certo grau de intolerância, quando aplicados em algumas culturas, tornando-os inviáveis para a comercialização (Ryals et al., 1996).

É importante ressaltar que até mesmo a aplicação de acibenzolar-S-methyl, produto bastante tolerado por várias culturas, pode causar fitotoxidez, como no tomate e no trigo, por exemplo, que podem apresentar intolerância ao produto, em certo estágio de desenvolvimento e em certas dosagens (R. Castro, comunicação pessoal).

4.2 Efeito da aplicação de acibenzolar-S-methyl sobre o desenvolvimento de *X. fastidiosa* em plantas de laranjeira 'Pera'

Treze meses após o início do ensaio, as plantas ainda não apresentaram nenhum sintoma característico de CVC. Com o auxílio de métodos de detecção de *X. fastidiosa*, pelo teste de ELISA ('Enzyme linked immunosorbent assay'), foi detectada a presença de *X. fastidiosa*, tanto em plantas ativadas, como nas plantas não ativadas pelo acibenzolar-S-methyl. Contudo, a frequência de plantas com resultado serológico positivo observada foi maior nas plantas que não sofreram aplicação do ativador de plantas em estudo (Figura 10).

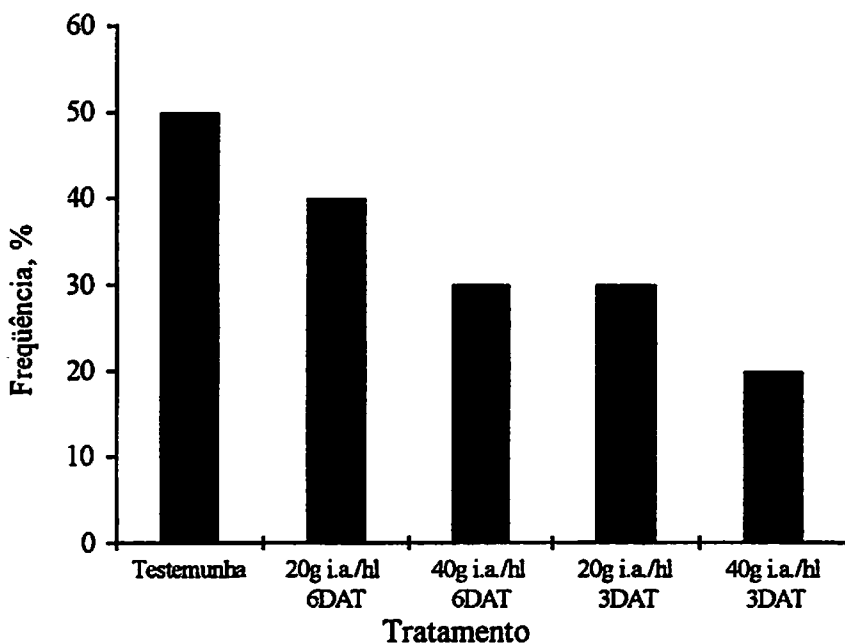


FIGURA 10 Frequência de plantas inoculadas, via borbulhas contaminadas, as quais tiveram resultado serológico positivo para *X. fastidiosa* (ELISA). UFLA, Lavras - MG, 1999.

As plantas ativadas pelo acibenzolar-S-methyl apresentaram densidades óticas menores no teste de ELISA, o que indica redução no número de bactérias apresentadas nas plantas, nas quais o teste de ELISA pôde detectá-las.

Os resultados da análise de variância, para o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 com tratamento adicional, para as densidades óticas a 405nm do teste de ELISA, estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8. Análise de variância, referente às leituras feitas no teste de ELISA, para detecção e quantificação de *X. fastidiosa* em plantas de laranjeira 'Pera' ativadas com acibenzolar-S-methyl. UFLA, Lavras - MG, 1999.

FV	GL	QM
Concentração (C)	1	242736,4000*
Época de Enxertia (E)	1	21253,1000 ^{ns}
C x E	1	9000,0000 ^{ns}
Adicional vs. Fatorial	1	3971125,62*
Erro	45	60021,3644
CV(%)		128,93

As plantas ativadas por acibenzolar-S-methyl diferiram, de forma significativa, das plantas não ativadas (Tabela 8), devido ao fato de haver diferença significativa entre o fatorial (plantas tratadas) e o adicional (testemunha). Pode-se concluir também que houve diferença significativa nas concentrações de bactérias das plantas ativadas, pelas diferentes concentrações de CGA245704.

4.2.1 Proteção oferecida pela aplicação de acibenzolar-S-methyl contra *X. fastidiosa*

Na Figura 11, tem-se a média obtida pela leitura do teste de ELISA a 405nm. Pode-se notar que as plantas que sofreram aplicação do acibenzolar-S-

methyl tiveram leituras menores que as plantas que não sofreram a aplicação do produto em estudo.

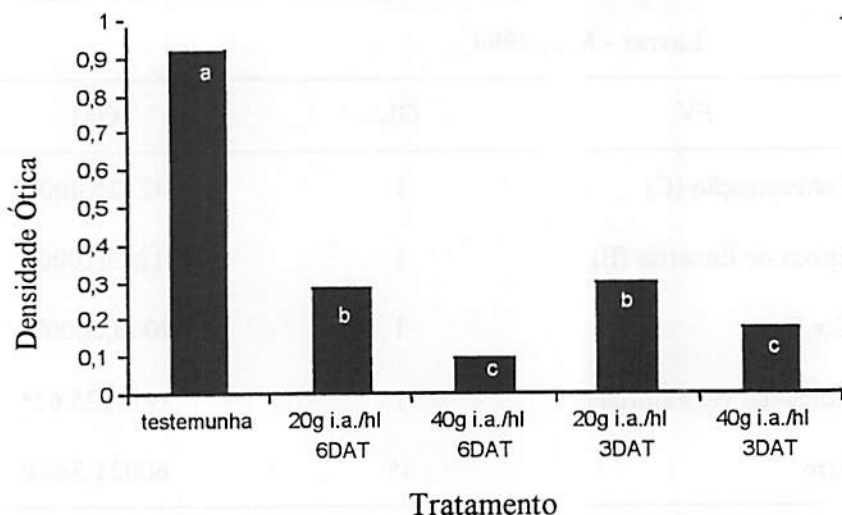


FIGURA 11 Média das leituras do teste de ELISA (densidade ótica a 405 nm), das plantas de laranjeira 'Pera' tratadas e não tratadas com acibenzolar-S-methyl e inoculadas com *X. fastidiosa*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Com base nos estudos realizados por Lima et al. (1997), comparando-se o número de bactérias com a densidade ótica do teste de ELISA, pode-se afirmar que as plantas ativadas pelo acibenzolar-S-methyl apresentam uma quantidade significativamente menor de bactéria. Com isso, pode-se determinar a proteção que o acibenzolar-S-methyl confere às plantas de laranjeira 'Pera' contra *X. fastidiosa* (Figura 12).

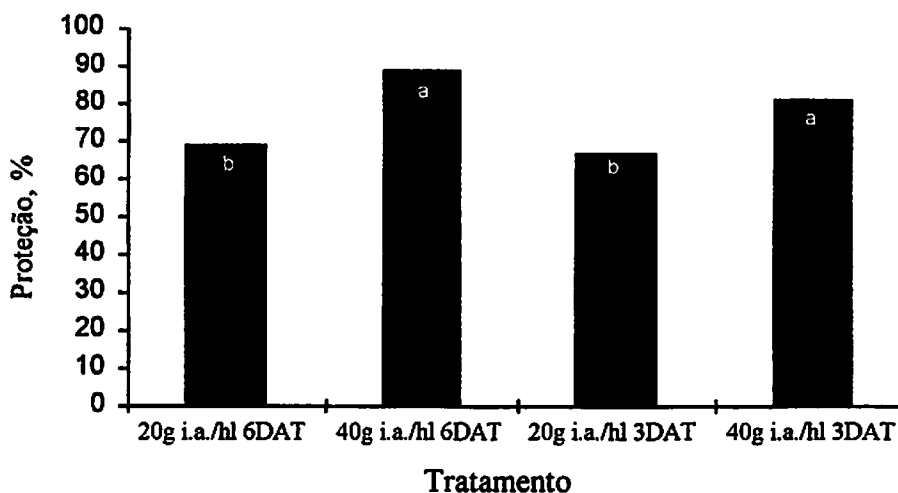


FIGURA 12 Porcentagem de proteção, obtida pela aplicação de CGA245704 50WG, às plantas de laranjeira 'Pera' contra *X. fastidiosa*. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Na Figura 12, pode-se notar que todos os tratamentos ofereceram proteção contra *X. fastidiosa*: 67,46%, 69,81%, 81,18% e 89,48% para os tratamentos de 20g i.a./hl a 3DAT, 20g i.a./hl a 6DAT, 40g i.a./hl a 3DAT, 40g i.a./hl a 6DAT, respectivamente. Detectou-se, pela análise de variância, diferença estatisticamente significativa entre as dosagens aplicadas. A dose de 40g i.a./hl teve maior eficiência para retardar o desenvolvimento de *X. fastidiosa*.

Trabalhando com cacau, Aguilar et al. (1998) observaram que aplicações de acibenzolar-S-methyl, com intervalos de sete dias antes da inoculação, quando comparadas a dois dias, proporcionaram maior eficiência na proteção de plantas de cacau contra a 'Vassoura de Bruxa'. Resende et al. (comunicação pessoal, 1999) confirmaram que, em condições controladas, mudas de cacau

apresentaram maior resposta na indução de resistência à inoculação de *Crinipellis pernicioso* na dose de 150 g i.a./100 litros com 30 dias de antecedência.

A variável 'época de inoculação', descrita anteriormente, não teve influência na proteção obtida pelas plantas contra *X. fastidiosa*. Esse fato pode estar relacionado à velocidade da inoculação e colonização dos vasos xilemáticos pela bactéria (via borbulhas contaminadas), pois os enxertos demoram entre 15 e 20 dias para estar completamente pegos, e assim, quando as bactérias chegam aos vasos xilemáticos, as plantas (de acordo com as 'épocas de inoculação', acima descritas) já estão em condições semelhantes de retardarem o desenvolvimento das mesmas.

O sistema de indução de resistência sistêmica em plantas já vem sendo descrito por vários pesquisadores do mundo todo. No Brasil, destacam-se os trabalhos realizados para o café, contra a ferrugem do cafeeiro, que conferem proteção acima de 90% (Martins et al., 1998) e para o cacau, reduzindo a incidência de Vassoura de Bruxa em mais de 60% (Aguilar et al., 1998).

No manejo da cultura dos citros, existem diversas doenças em que seu controle é feito pelo controle dos vetores, a exemplo da CVC, pois não existe nenhum produto de ação direta à bactéria *X. fastidiosa*.

Várias experiências com essa nova tecnologia de proteção às plantas são citadas na literatura e, com os citros, os resultados não poderiam ser diferentes. Com os resultados apresentados, pode-se afirmar que a aplicação de acibenzolar-S-metil conferiu proteção às plantas de laranjeira 'Pera' contra *X. fastidiosa*, quando inoculadas artificialmente. Esta proteção, conferida pela aplicação de acibenzolar-S-metil, sugere que a resistência sistêmica das plantas tenha sido ativada, apontando como uma importante ferramenta de uso prático no manejo integrado da Clorose Variegada dos Citros.

Com o surgimento dessa nova classe de produtos, que induz as plantas a se protegerem do ataque de patógenos, dá-se início a uma nova era no manejo de pragas e doenças desta cultura.

5 CONCLUSÕES

Para as condições nas quais os resultados foram obtidos, pode-se concluir que a aplicação de acibenzolar-S-methyl confere proteção às plantas de laranjeira 'Pera' contra *X. fastidiosa* e não influencia o desenvolvimento das plantas.

--

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, M. A. G.; RESENDE, M. L. V.; BEZERRA, K. M. T. Resistência induzida em cacaueiro contra *Crinipellis pernicioso* pelo 'plant activator'. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.23, suplemento, p.220, 1998.
- BERETTA, M. J. G.; DERRICK, K. S.; LEE, R. F.; et al. Testes de diagnósticos para a detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* em citros. *Laranja*, Cordeirópolis, v.18, n.1, p.113-122, 1997.
- BERETTA, M. J. G.; LEE, R. F.; BARTHE, G. A.; et al. 1993. Citrus variegated chlorosis detection of *Xylella fastidiosa* in symptomless trees. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, 1992, India. *Proceedings...* Riverside: IOCV, 1993. p.306-310.
- BRLANSKY, R. H.; DAVIS, C. L.; LEE, R. F.; et al. Immunogold localization of xylem-inhabiting bacteria affecting citrus in Argentina and Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, 1992, India. *Proceedings...* Riverside: IOCV, 1993. p.311-319.
- CARLOS, E. F.; CABRITA, J. R. M.; RODAS, V. Z.; et al. Uso da poda em pomares com CVC. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: FUNDECITRUS, 1997. v.1, p.113-122.
- CHAGAS, C. M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M. J. G. Electron microscopy studies of xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus chlorosis in Brazil. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.134, n.5, p.306-312, MAY/1992.
- CHANG, C. J.; GARNIER, M.; ZREIK, C.; et al. Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, 1992, India. *Proceedings...* Riverside: IOCV, 1993. p.294-300.
- CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quarterly Review of Biology* v.8, n.1, p.275-324, 1933.

- DE NEGRI, J. D. **Clorose variegada dos citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais.** Campinas: CATI, 1990. 6p. (Comunicado Técnico, 82).
- DE NEGRI, J. D.; GARCIA JÚNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada dos citros. **Laranja, Cordeirópolis**, v.14, n.1, p.255-267, 1993.
- FAJARDO, J. E.; McCOLLUM, T. G.; McDONALD, R. E.; et al. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. **Biological Control, Orlando**, v. 13, n.3, p. 143-151, NOV/1998.
- FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; et al. Benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal, York**, v.10, n.1, p.61-70, JAN/1996.
- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science, Washington**, v.261, n.5122, p.754-756, AUG/1993.
- GARNIER, M.; CHANG, C. J.; ZREIK, L.; et al. Citrus variegated chlorosis: Serological detection of *Xylella fastidiosa*, the bacterium associated with the disease. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, 1992, India. **Proceedings...** Riverside: IOCV, 1993. p.301-305.
- GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF BEITER, G.; et al. Benzothiadiazoles, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell, Rockville**, v.8, n.4, p.629-643, APR/1996.
- GRAVENA, S.; DE NEGRI, J. D.; QUAGGIO, J. A.; et al. Manejo de cigarrinhas e CVC no pomar. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. **Clorose Variegada dos Citros.** Bebedouro: FUNDECITRUS, 1997a. v.1, p.93-111.
- GRAVENA, S.; LOPES, J. R. S.; PAIVA, P. E. B.; et al. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. **Clorose Variegada dos Citros.** Bebedouro: FUNDECITRUS, 1997b. v.1, p.37-53.

- HARAKAVA, R. M.; BERETTA, M. J. G. Obtenção de anticorpos para *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros, a partir de ovos postos por galinhas poedeiras imunizadas. *Laranja, Cordeirópolis*, v.15, n.1, p.87-95. 1994.
- INBAR, M.; DOOSTDAR, H.; SONODA, R. M.; et al. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. *Journal of Chemical Ecology*. New York, v.24, n.1, p.135-149, JAN/1998.
- KESSMANN, H.; STAUB, T.; LIGON, J.; et al. Activation of systemic acquired disease resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.100, n.6, p.359-369. DEC/1994.
- KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I. E. Defence responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research* New York, v.21, n.1, p.1-34. JAN/1995.
- KRUGNER, R.; LOPES, M. T. V. de C.; SANTOS, J. S.; et al. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, 1998, Brazil. *Proceedings...* Riverside: IOCV, 1998. p.81.
- LAWTON, K.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; et al. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal*, Heslington, v.10, n.1, p.71-82, JAN/1996.
- LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C.; TRAVENSOLO, R. F.; et al. Extração rápida de DNA de *Xylella fastidiosa* visando a otimização da reação de PCR para diagnóstico da CVC. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, suplemento, p.235, 1997.
- LI, W. Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à Clorose Variegada dos Citros. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1997. 103p. (Tese - Doutorado em Produção Vegetal).

- LIMA, J. E. O.; COTINHO, A.; ROBERTO, S. R.; et al. Clorose Variegada dos Citros - multiplicação de plantas doentes para estudo, limpeza de borbulhas e diagnóstico por microscopia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador. Resumos... Salvador: SBF, 1994. p.374-375.
- LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; ROBERTO, S. R.; et al. Diagnose da Clorose Variegada dos Citros por microscopia ótica. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.3, p.370-374, SET/1997.
- LOPES, J. R. S.; BERETTA, M. J. G.; HARAKAVA, R.; et al. A confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da Clorose Variegada dos Citros, *Xylella fastidiosa*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, suplemento, p.343, AGO/1996.
- MADAMANCHI, N. R.; KUC, J. Induced systemic resistance in plants. In: COLE, G. T.; HOCH, H., (eds). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York: Plenum Press, 1991, p.347-362.
- MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D.; et al. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, Washington, v.250, n.4983, p.1002-1004, NOV/1990.
- MALAVOLTA, E.; MALAVOLTA, M. L.; CABRAL, C. P.; et al. Nova anomalia dos citros: estudos preliminares. *Laranja*, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.15-18, 1990.
- MALAVOLTA, E.; PRATES, H. S. Alteração na composição mineral das folhas de pomares afetados pela anomalia “amarelinho” ou clorose variegada. *Laranja*, Cordeirópolis, v.12, n.2, p.315-329, 1991.
- MALAVOLTA, E.; PRATES, H. S.; PINTO, W. B. da S. Levantamento e observações sobre o “amarelinho” ou “clorose variegada dos citros”. *Laranja*, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.503-513. 1992.
- MARTINS, E. M. F.; GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M. de; et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl (Bion) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 24, 1998, Poços de Caldas. Resumos... Rio de Janeiro: MARA/CNC, 1998. p.177-178.

- METRAUX, J. P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; et al. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, Washington, v.250, n.4983, p.1004-1006, NOV/1990.
- MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; et al. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, St Paul, v.84, n.5, p.456-461, MAY/1994.
- POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology*, New York, v.31, n.6, p.377-381. NOV-DEZ/1995.
- ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; LIMA, J. E. O. de; et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* (Hemiptera: Cicadellidae) em citros. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, n.4, p.517-518, DEZ/1996.
- ROSS, F. A. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology*, New York, v.14, n.6, p.340-358, JUL/1961.
- ROSSETTI, V.; CARVALHO, M. L. V.; CHAGAS, C. M. Clorose Variegada dos citros (CVC) - transmissibilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador. Resumos... Salvador: SBF, 1994. p.379-380.
- ROSSETTI, V.; CARVALHO, M. L. V.; CHAGAS, C. M. Evidência indireta do envolvimento de insetos vetores na transmissão de clorose variegada dos citros (CVC). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, suplemento, p.266. 1993.
- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J. D. Clorose Variegada dos Citros (CVC). *Laranja*, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.1-14, 1990a.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M. B.; BERETTA, M. J. G.; et al. Présence de bactéries dans de le xylème d'orangers atteints de chorose variegée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. Paris: C. R. S. Acad. Sci., 1990b. p.345-349. (Séries, 3).

- RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; et al. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, Rockville, v.8, n.10, p.1809-1819, OCT/1996.
- SALVA, R. A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Situação da Clorose Variegada dos Citros no estado de São Paulo. *Laranja*, Cordeirópolis, v.16, n.2, p.155-164, 1995.
- SEMPIONATO, O. R.; GIROTTO, L. F.; STUCHI, E. S. Produção de mudas sadias. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: FUNDECITRUS, 1997. v.1, p.75-92.
- TUBELIS, A.; BARROS, J. C.; LEITE, R. M. V. B. Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. *Laranja*, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.239-254, 1993.
- VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; AHL-GOY, P.; et al. 2,6-dichloroisonicotinic acid - induced resistance to pathogens does not require the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant Microbe Interaction*. v.8, n.3, p. 228-234. MAR/1995.
- VITTI, G. C.; MARCHI, R. J.; BORELLA, M. L.; et al. Estudo de prováveis desequilíbrios nutricionais em pomares cítricos no município de Colina - SP. Jaboticabal: FCAV, UNESP, 1989, 12p. (mimeografado).
- WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; et al. Coordinate gene activity in tobacco to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, Rockville, v.3, n.10, p.1085-1094, OCT/1991.
- WHITE, R. F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, New York, v.99, n.2, p.410-412, DEC/1979.
- YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R. Aspectos relacionados às principais espécies de cicadelineos (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) que ocorrem em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16, 1997, Salvador. Resumos... Salvador: SBF, 1997. p.237.