

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITROS**

ADRIANO ROBERTO AGNELLI

**Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da
bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Nelson Arno Wulff

Araraquara
Maio-2011

ADRIANO ROBERTO AGNELLI

**Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da
bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Nelson Arno Wulff

Araraquara
Maio-2011

A216p

Agnelli, Adriano Roberto
Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria
Candidatus Liberibacter asiaticus em plantas cítricas / Adriano Roberto
Agnelli. – Araraquara, 2011.
44 p.

Dissertação (Mestrado) – Fundo de Defesa da Citricultura
Orientador: Nelson Arno Wulff

1. Indução de resistência 2. Bion 3. Acibenzolar-S-metil 4.
Huanglongbing 5. Greening I. Título

ADRIANO ROBERTO AGNELLI

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade.

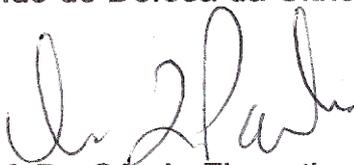
Araraquara, 18 de maio de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Arno Wulff (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara



Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara



Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba

Aos meus filhos **Luiz Fernando Bedoni Agnelli, Victória Haeck Van Hoof e Catarina Haeck Agnelli**, forma mais singela de vida; que esta obra sirva-lhes de inspiração e que possa trazer-lhes futuramente, a paixão pelo estudo das Ciências.

Dedico

A minha querida esposa **Liceia Paula Franco Haeck Agnelli**, pelo infinito amor e apoio na realização dos meus sonhos.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos irmãos Antonio Aparecido Baraldi e José Adair Baraldi, “Chefinho”, sócios proprietários do Grupo Citrolândia, pelo amplo e irrestrito apoio na realização deste Curso de Mestrado Profissionalizante.

Agradeço ao Fundecitrus pela oportunidade de realização do curso e apoio na condução dos experimentos.

Aos meus pais Ernani e Cleuza Rodrigues Agnelli, que ao longo da vida abdicaram de seus sonhos em prol da formação dos filhos.

Ao Prof. Dr. Nelson Arno Wulff pela dedicação, convívio e solicitude na orientação conduzida.

À técnica de laboratório Elaine Cristina Martins pela disponibilidade e eficiência nos trabalhos realizados.

Aos funcionários do laboratório Daniela, Deividson, Eder, Fernanda, Jean, Juliana, Rodrigo e Sidnei pelo empenho e participação direta na realização dos trabalhos.

Aos professores do Curso de Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros, pela competência e habilidade de transformar informação em conhecimento.

Ao Prof. Dr. José Belasque Jr. pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os companheiros de curso pela boa convivência e laços de amizade formados ao longo deste tempo e, em especial ao amigo Pedro Eduardo Franco (Supervisor Agrícola L. D. Commodities), parceiro também de uma vida, cujo convívio me traz grande satisfação.

...A resistência é o resultado de uma alma que não se conforma com o sofrimento, luta incansavelmente, superando as tribulações, vendo além das tempestades um caminho de luz e segurança. Essa alma cresce do tamanho de seus sonhos e vê nas dificuldades degraus para se alcançar a vitória almejada...

Harold Wilson

A resistência constitui uma experiência necessária e fundamental para o corpo humano; através dela, o corpo é despertado para o mundo em que vive. (...) O corpo só se torna vivo ao lidar com dificuldades e superá-las.

Richard Sennett

Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas

Autor: ADRIANO ROBERTO AGNELLI

Orientador: Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF

RESUMO

O Huanglongbing (HLB), também conhecido como Greening, é a mais destrutiva doença dos citros, podendo colocar em risco a condição do Brasil de maior produtor e exportador mundial de suco de laranja. Face aos prejuízos potenciais dessa doença e ao difícil manejo, o setor citrícola busca novos métodos de controle que além de eficazes, sejam também menos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente. Tem-se veiculado a possibilidade do uso de produtos e substâncias indutoras de resistência no controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente associado ao HLB. No entanto, pouco se conhece a respeito do efeito de tais produtos como agentes preventivos ou curativos no controle do HLB. Os tratamentos foliares especiais contêm indutores de resistência e uma gama de nutrientes foliares, sendo que estes podem mascarar os sintomas do HLB na planta. Mesmo assim, citricultores da Flórida (EUA) e do estado de São Paulo vem adotando esse manejo como medida de controle da doença. Com o objetivo de avaliar o efeito de indutores de resistência conhecidos por terem resultados positivos em outros patossistemas, realizaram-se experimentos sob condições controladas. Plantas com nove meses de idade foram inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* através da enxertia de ramos sintomáticos. Estas plantas foram submetidas à aplicação dos seguintes produtos: ácido jasmônico, ácido gentísico, Bion[®], Ecolife[®], Agromos[®], metil jasmonato, peróxido de hidrogênio, ácido salicílico e Bion[®] combinado com peróxido de hidrogênio. Os produtos foram aplicados em quatro (Experimento I) ou cinco (Experimento II) ocasiões, iniciando-se no momento da enxertia. Avaliou-se a sintomatologia e a presença do patógeno por PCR convencional. Não houve efeito dos tratamentos sobre o tipo e intensidade de sintomas e somente o Bion[®] retardou o número de plantas cítricas infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Tal efeito foi diretamente proporcional à quantidade do produto aplicado e teve durabilidade limitada. O peróxido de hidrogênio, um sinalizador intracelular em muitas plantas e frequentemente empregado em tratamentos nutricionais no campo, suprimiu a ação do Bion[®].

O uso potencial do Bion[®] ou de quaisquer outros produtos que venham se mostrar eficazes em suprimir ou retardar infecções frente *Candidatus Liberibacter* spp., como demonstrado nos experimentos aqui conduzidos deve também ser testado com a transmissão da bactéria do HLB através do vetor *Diaphorina citri* e sob condições de campo antes que o seu uso no manejo possa ser recomendado.

Palavras chave: indução de resistência, Bion[®], acibenzolar-S-metil, Huanglongbing, Greening

Potential of Resistance Inducers on the Control of *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* in Citrus Plants

Author: ADRIANO ROBERTO AGNELLI

Advisor: Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), also known as Greening, is the most destructive disease of citrus. HLB may jeopardize the condition of Brazil as the largest producer and trader of orange juice worldwide. Given the potential damage of this disease and the lack of fully efficient control measures, one challenge is to search for strategies of control that are both effective and friendly to human health and to the environment. Therefore, the use of substances that could induce host resistance for the control of the bacterium *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*, agent associated with HLB, is envisaged. Little is known about the preventive use of resistance inducers in citrus. Special Foliar treatments containing both resistance inducers and foliar nutrients have been used by citrus growers in Florida (USA) and São Paulo to alleviate HLB symptoms. However, little is known about the isolated effect of resistance inducers in citrus against this disease. Aiming at filling this gap, we evaluated under controlled conditions the effect of resistance inducers known to have some positive effect in other pathosystems. Nine-month-old citrus plants were inoculated with *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* by grafting HLB-symptomatic branches. The following treatments were applied to plants: jasmonic acid, gentisic acid, Bion[®]; Ecolife[®]; Agromos[®], methyl jasmonate, hydrogen peroxide, salicylic acid, and Bion[®] combined with hydrogen peroxide. Treatments were applied four (Experiment I) or five (Experiment II) times, starting from grafting. We evaluated the expression of symptoms in plants and the presence of the pathogen by conventional PCR. There was no effect of treatments on symptom expression. Only Bion[®] was effective in decreasing the number of infection of citrus trees by *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*. Such an effect was directly proportional to the product doses used and had limited durability. Hydrogen peroxide, an intracellular signaling compound in many plants and often used in nutritional treatments in the field, suppressed the action of Bion[®]. Potential use of Bion[®] or other products against HLB that may prove effective in suppressing infections or

slow forward *Candidatus Liberibacter asiaticus* have to be tested with insect transmission and under field conditions before use in citrus groves as a management practice.

Key words: Induced resistance, Bion[®], acybenzolar-S-methyl, Huanglongbing, Greening

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Defesa de plantas contra o ataque de patógenos	4
2.2 Indução de resistência	6
2.2.1 Resistência local ou reação hipersensível (RH)	7
2.2.2 Resistência sistêmica adquirida (RSA) e resistência sistêmica induzida (RSI)	7
2.2.3 Indutores de resistência	8
2.2.4 Mecanismos de defesa exibidos pela planta após a indução de resistência	10
2.2.4.1 Proteínas-RP (“pathogenesis-related proteins”)	10
2.2.4.2 Fenóis	11
2.2.4.3 Fitoalexinas	12
2.2.4.4 Produção de radicais livres	12
2.2.4.5 Lignificação e barreiras histológicas	13
2.2.5 Indutores de RSI e o controle de doenças de plantas	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Plantas e fonte de inóculo	17
3.2 Enxertia	18
3.3 Indutores de resistência	19
3.4 Avaliação das plantas	21
3.5 Análise estatística	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Experimento I	23
4.2 Experimento II	32
5 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

O setor agroindustrial citrícola brasileiro apresenta números que impressionam. Em nenhum outro produto de exportação do agronegócio o país tem expressividade semelhante. De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos nas fábricas brasileiras. O país detém atualmente mais da metade da produção de suco de laranja sendo 98% destinados a exportação. Em 2010 foram quase 165 milhões de árvores produzindo e na Flórida, seu principal concorrente, 60 milhões. Flórida e São Paulo detêm 81% da produção mundial de suco. Só o estado de São Paulo 53% do total. Perto de 400 municípios paulistas se dedicam ao cultivo da laranja, de onde saem 80% da produção nacional (Neves et al., 2010).

Entretanto, este robusto crescimento das últimas décadas, com uma forte concentração da área produtiva no chamado cinturão citrícola paulista e sul do triângulo mineiro, esteve associado ao aumento de novas pragas e doenças. Doenças como a Clorose Variegada dos Citros, a Morte Súbita dos Citros, o Cancro Cítrico e o Huanglongbing (HLB) foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores nesta última década, com perdas de quase 80 milhões de caixas por ano (Neves et al., 2010). Desde sua descoberta em 2004, uma das preocupações mais sérias do setor é o HLB também conhecido como Greening dos citros.

O HLB é considerado a doença mais destrutiva da cultura dos citros, pela severidade dos sintomas, rapidez com que dissemina nas plantas cítricas e entre propriedades e também pela falta de resistência genética no gênero *Citrus*. Não há métodos de controle curativo para o HLB que possam ser usados nos pomares. Assim, prevenir infecções das plantas é fundamental no controle da doença. Os pomares cítricos dos continentes Asiático, Africano e Oceania, além de mais recentemente o continente Americano, incluídas as principais regiões produtoras (Brasil, São Paulo e Estados Unidos, Flórida) apresentam plantas afetadas pela doença, totalizando mais de 40 países (Teixeira et al., 2010).

No Brasil, o HLB está associado a duas espécies da bactéria bastonete Gram-negativas denominadas *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* e a um fitoplasma do grupo IX (Teixeira et al., 2009). Ambas liberibactérias são transmitidas por enxertia de ramos infectados (Lin, 1963; Lopes & Frare, 2008) e pelo vetor *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) (Capoor et al., 1967; Gasparoto et al., 2010). Todas as variedades cítricas e murta (*Murraya* spp.) são hospedeiras do vetor e de liberibacter e podem servir como fonte de inóculo. (Halbert & Manjunath, 2004; Lopes et al., 2005; Lopes et al., 2006).

A partir do ramo infectado, a bactéria coloniza a planta afetando o fluxo e a distribuição de seiva do floema, tornando a planta improdutiva entre dois e cinco anos. Plantas jovens e infectadas não produzem de forma viável (Fundecitrus, 2008). Inicialmente ramos amarelos se destacam em relação ao restante da copa. As plantas afetadas exibem folhas mosqueadas (clorose assimétrica) e folhas com sintomas similares aos provocados por deficiências minerais, particularmente de zinco, manganês e ferro. Ocorre também a deformação dos frutos, abortamento de sementes, queda de folhas e frutos e morte de brotações (da Graça, 1991).

Para o manejo da doença é preconizado a utilização de mudas saudáveis, inspeção dos pomares acompanhada de erradicação das plantas infectadas, eliminação da murta e controle rigoroso do vetor através do monitoramento e aplicação de inseticidas (Bové, 2006). Apesar de relativamente difícil, o controle do HLB é possível e pode ser conseguido quando as medidas de controle são integradas, e será mais efetivo quando o manejo regional for realizado (Belasque Júnior et al., 2008). Recentes resultados de pesquisa confirmaram que tentativas de controlar o HLB localmente apresentam menores chances de sucesso quando comparado ao manejo em larga escala ou em escala regional (Bassanezzi et al., 2009).

A preocupação crescente com esta devastadora doença que coloca em risco a sustentabilidade do agronegócio citrícola tem estimulado a busca pelo setor produtivo de tecnologias economicamente mais viáveis, sendo ao mesmo tempo eficiente e menos agressivas à saúde humana e ao meio ambiente. Dentro desse contexto, a indução de resistência é um método de controle não convencional, porém que apresenta potencial para o controle do HLB, principalmente se utilizada de maneira integrada com outras medidas de controle. A existência nas plantas de barreiras físicas e bioquímicas, bem como a indução de resistência são mecanismos naturais existentes nas espécies vegetais e que são utilizados para se defenderem do ataque de diversos agentes causadores de doença tais como bactérias, fungos e vírus. Esses mecanismos de defesa podem ser explorados pelo homem para o controle de doenças através da aplicação de agentes indutores capazes de produzir uma resposta de defesa nas plantas contra o ataque de fitopatógenos.

Na Flórida (EUA), há relatos do emprego de um Manejo Foliar Especial para o controle de pragas e doenças na citricultura e que chamou a atenção de técnicos e pesquisadores em razão do aspecto apresentado pelas plantas cítricas afetadas pelo HLB (Mattos Jr. et al., 2010). Esse tratamento foliar especial é composto por agentes indutores e nutrientes foliares que podem atuar como mitigadores dos sintomas da doença. Tanto na Flórida como no estado de São Paulo, algumas empresas exploram comercialmente esses

produtos e citricultores vêm adotando o seu uso sem que haja por parte da pesquisa uma comprovação dos seus efeitos no controle do HLB. A tomada de decisão pelo uso de indutores de resistência no controle do HLB deve se basear em resultados experimentais e científicos.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do uso de produtos e substâncias indutoras de resistência para impedir a infecção de citros pela bactéria *Ca. L. asiaticus*, agente associado ao Huanglongbing.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Defesa de plantas contra o ataque de patógenos

Há uma premissa em fitopatologia que diz: “na natureza a resistência é regra e a suscetibilidade a exceção” (Agrios, 2005). Dentre milhares de microrganismos conhecidos e que estão diretamente em contato com as plantas tais como nematóides, fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e viróides somente algumas dezenas tem a capacidade de causar doenças em plantas e, na maioria das vezes, de uma forma bastante específica. Se assim não fosse, caso todos esses microrganismos atacassem indistintamente qualquer gênero de planta, o reino vegetal provavelmente não existiria. Isto não acontece, porque as plantas no decorrer do processo de evolução e coevolução desenvolveram uma série de mecanismos efetivos de defesa para resistirem ao ataque desses patógenos. Recentemente, hipotetizou-se que os viróides foram introduzidos (século I) nos citros a partir de uma provável transmissão mecânica (homem) oriunda de videiras assintomáticas na bacia do mediterrâneo (Bar-Joseph, 1996). Este exemplo postula como a coevolução atuou nos ancestrais da videira selecionando uma série de mecanismo de defesa, enquanto que os citros, recém chegados na região, expressaram suscetibilidade a esses viróides em seus tecidos.

Assim sendo, podemos afirmar que as plantas não permitem de forma passiva a entrada de patógenos no seu interior. Pelo contrário, elas percebem as agressões e a sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo tendo, muitas vezes, seu desenvolvimento prejudicado (Margis-Pinheiro et al., 1999).

A resistência da planta a um determinado patógeno é definida como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada de um microrganismo em seu interior, bem como criar condições adversas para a colonização de seus tecidos pelo mesmo (Pascholati & Leite, 1995). A resistência a patógenos é usualmente complexa e os fatores relacionados com as respostas de defesa ocorre por um conjunto de mecanismos ou barreiras pré ou pós-formados (Figura 1). Os pré-formados são aqueles mecanismos de defesa existentes e independentes da chegada do patógeno no sítio de infecção. Em contraposição, as plantas possuem outros mecanismos de defesa que permanecem inativos ou latentes, sendo acionados somente após a chegada do patógeno. As defesas vegetais podem também ser classificadas como estruturais, quando baseadas em características anatômicas, e bioquímicas, quando relacionadas a compostos biologicamente ativos (Shewry & Lucas, 1997). Enquanto que os mecanismos de defesa estruturais (físicos) atrasam ou impedem a penetração dos

patógenos, os bioquímicos inibem o crescimento, criando condições adversas para o crescimento dos patógenos. Fatores anatômicos constitutivos ou bioquímicos, como cutículas, parede celular e inibidores podem ser suficientes para prevenir a colonização dos tecidos vegetais. Contudo, se a penetração ocorrer, os mecanismos de defesa pós-formados são ativados. Este inclui a rápida geração de espécies reativas de oxigênio, alterações em polímero da parede celular, síntese de fitoalexinas, produção de proteínas relacionadas à patogênese e uma rápida resposta de hipersensibilidade seguida por morte celular programada. Coletivamente, esses sistemas primeiro inibem e depois impedem o potencial colonizador dos patógenos (Shewry & Lucas, 1997).

<p>PRÉ-FORMADOS (Passivos, constitutivos)</p> <p>Estrutural</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cutícula • Tricomas • Estômatos • Fibras/Vasos condutores <p>Bioquímico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fenóis • Alcalóides • Lactonas insaturadas • Glicosídeos fenólicos • Glicosídeos cianogênicos • Fototoxinas • Inibidores protéicos • Proteínas - RP 	<p>PÓS-FORMADOS (ativos, induzíveis)</p> <p>Estrutural</p> <ul style="list-style-type: none"> • Papilas halos • Lignificação • Camadas de cortiça • Tiloses <p>Bioquímico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fitoalexinas • Proteínas - RP
--	---

Figura 1 - Fatores de resistência pré e pós-formados (Pascolati & Leite, 1995).

Resumidamente, a maior parte dos encontros entre plantas e microrganismos resulta em uma relação incompatível, ou seja, não há manifestação de doença. Em uma relação incompatível planta-patógeno, a combinação de barreiras químicas e estruturais, pré e pós-formadas, impede o sucesso do patógeno. Já na relação compatível, alguma etapa do processo falha, seja pela falta de produção ou desativação dos compostos de defesa ou pela ausência de um fator essencial ao reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro (Moraes, 1998).

2.2 Indução de resistência

De maneira geral, o fenômeno da indução de resistência sistêmica pode ser comparado com a resposta imune inata (mediada por anticorpos) de animais e seres humanos em seus efeitos finais de proteção, ainda que os mecanismos sejam totalmente diferentes em sua natureza.

A indução de resistência consiste no aumento do nível de resistência por meio da ativação de genes que codificam diversas respostas de defesa vegetal sem alterar o genoma, através da utilização de agentes externos (indutores) bióticos ou abióticos. A indução de resistência possui características como: i) atividade sobre uma ampla gama de organismos; ii) estabilidade devido à ativação de diversos mecanismos de defesa; iii) proteção de caráter sistêmico, persistente e natural; iv) transmissão por enxertia; v) economia de energia metabólica e vi) utilização do potencial genético para resistência em todas as plantas suscetíveis (Bonaldo et al., 2005).

É importante salientar que um dos critérios para confirmar se a resistência exibida pela planta foi induzida é a ausência por parte do agente indutor de uma ação antimicrobiana ou a sua transformação em agentes antimicrobianos. Seu efeito deve estar unicamente relacionado com a sua capacidade de sensibilizar a planta, e desta em ativar os seus mecanismos de defesa estruturais e bioquímico. A resistência usualmente é complexa e tem como base a ação combinada de diversos fatores e não apenas um componente (Soares & Machado, 2007). A resistência induzida se mostrou efetiva contra fungos, vírus, bactérias, insetos, ácaros e nematóides (Lucas, 1999; Ogallo & McClure, 1996; Sticher et al., 1997). O fenômeno envolve três manifestações diferentes descritas a seguir.

2.2.1 Resistência local ou reação hipersensível (RH)

Quando um microrganismo patogênico invade o tecido de uma planta pode induzir mudanças drásticas na atividade metabólica das células vegetais ao redor do sítio de infecção e levar à indução de resistência. Esse mecanismo é conhecido como reação hipersensível (RH), que é caracterizada por uma rápida morte celular no local da infecção que resulta na formação (menos de 24 horas após a inoculação) de halos necróticos ao redor do sítio de invasão e no conseqüente confinamento do patógeno (Romeiro, 2008).

2.2.2 Resistência sistêmica adquirida (RSA) e resistência sistêmica induzida (RSI)

Ambas designam o fenômeno pelo qual as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, como também em locais distantes, de forma mais ou menos generalizada e sistêmica (Sticher et al., 1997). RSA e a RSI foram consideradas sinônimas e de funções análogas, porém atualmente pesquisadores parecem concordar sobre a distinção da forma pelas quais esses mecanismos de resistência são induzidos. Embora os efeitos fenotipicamente sejam semelhantes, na RSA a planta que sofreu indução pode exibir necrose a partir do sítio de infecção, o agente indutor geralmente é um patógeno ou ativador químico, sua indução é salicilato dependente e envolve o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP). No caso da RSI, o indutor não provoca sintomas como necroses no local da infecção, o agente indutor é usualmente um microrganismo não-patogênico, sua indução não é salicilato dependente e não há acúmulo de proteínas-RP (Romeiro, 2008).

De qualquer maneira, independente do agente biótico indutor, a comunicação cruzada entre as diferentes rotas foi demonstrada e, portanto, para se evitar confusões, alguns autores preferem o uso do termo geral “resistência induzida” (Silva et al., 2008).

Em ambas a resistência é expressa de forma induzida, resistência esta com caráter sistêmico que são efetivas contra um amplo espectro de patógenos tais como fungos, bactérias e vírus (Lucas, 1999; Sticher et al., 1997; Van Loon et al., 1998).

Do ponto de vista evolucionário, as plantas desenvolveram um sistema de defesa latente com a finalidade de economizar energia e substrato. A resistência induzida em condições naturais representará custo somente na presença do patógeno. A resistência constitutiva representa um custo para a planta, uma vez que independente da presença do patógeno esta investe seus limitados recursos na defesa. Plantas que investem seus recursos

para se defenderem na ausência de patógenos arcarão com custos que podem refletir na produtividade (Faulin, 2010).

2.2.3 Indutores de resistência

No fenômeno da indução de resistência ocorre a ativação dos mecanismos de defesa da planta por meio de uma cascata de eventos e sinais que se inicia no reconhecimento do agente agressor e culmina com a ativação das barreiras estruturais e bioquímicas envolvidas no processo. Como se aplica o agente de indução em um local da planta e os mecanismos de defesa são ativados em outras partes distantes, pressupõe-se que deva existir algum tipo de sinal químico, bioquímico, energético ou de natureza ainda desconhecida que deve ter sua origem no sítio de indução e seja enviado a locais mais distantes numa espécie de reação em cadeia. Os candidatos a sinalizador intracelular são o ácido salicílico, ácido jasmônico e seus derivados, etileno, sisteminas e sinais elétricos (Kuč, 1995; Romeiro, 2008).

O ácido salicílico (AS) é um mensageiro secundário endógeno que induz a expressão de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida (RSA), ou seja, expressão de proteínas-RP, peroxidases e fitoalexinas (Bonaldo et al., 2005; Cavalcanti et al., 2005). Provavelmente sintetizado na via dos fenilpropanóides, o AS tem o ácido benzóico como precursor (Hammerschmidt & Kuč, 1995). Quando aplicado na forma exógena, é capaz de induzir aumento da síntese do próprio AS nos tecidos vegetais (Repka et al., 2001), devido ao aumento da atividade de enzimas da via dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (FAL), através do qual o AS é sintetizado, podendo induzir a produção de proteínas-RP e, conseqüentemente, proteger as plantas contra o ataque de patógenos (Spletzer & Enyedi, 1999). Além disso, pode gerar em várias plantas a produção de um composto volátil, o metil-salicilato (MeSA). Este derivado do AS pode induzir plantas a sintetizar o AS, podendo desencadear respostas de defesa nestas plantas (Shulaev et al., 1997).

Em alguns patossistemas tem sido demonstrado que durante infecções sistêmicas não necrotróficas, o AS pode ser convertido em ácido gentísico (AG), o qual acumula no tecido vegetal afetado. A aplicação exógena de AG induz a produção de proteínas-RP não relacionadas àquelas induzidas pelo AS. Tal fato indica que o AG pode ser uma molécula sinalizadora induzida por patógenos, complementar ao AS na ativação dos mecanismos de defesa vegetal (Belles et al., 1999; Fayos et al., 2006).

Nas décadas de 60 e 70, a cromatografia de camada delgada foi empregada com sucesso na indexação e diagnose do HLB em plantas cítricas (Shwarz, 1968; Graça, 1991),

devido à ocorrência de um composto fenólico glicosilado, identificado como um éster de glicose do ácido gentísico, nas plantas doentes (Feldman & Hanks, 1969). A forma aglicona do marcador, o ácido gentísico (AG), é um composto fenólico encontrado em diversas plantas, cuja quantidade aumenta consideravelmente nos tecidos cítricos afetados pelo HLB, porém a quantidade deste composto não está correlacionada à tolerância ou suscetibilidade ao HLB (Van Lelyveld et al., 1988; Hooker et al., 1993). Schwarz & Van Vuuren (1970) observaram estreita correlação da presença do marcador fenólico com a ocorrência do HLB em laranjas doces, mandarinas e tangelos e pouca correlação em limões e grapefruits.

O ácido jasmônico (AJ) e seus derivados jasmonatos são reguladores vegetais endógenos produzidos por várias espécies vegetais, que atuam no mecanismo de defesa das plantas e agem como sinalizador de estresse (Cortês, 2000). O AJ representa um tipo de fitohormônio que participa de múltiplos processos anato-fisiológicos, como alongamento de raízes, aberturas de estômatos, senescência, entre outros (Koda, 1992). A frequência com que ocorrem nos tecidos vegetais, aliada a sua conhecida mobilidade nos tecidos sugere uma função sinalizadora, embora algumas controvérsias experimentais desconsiderem a função do AJ como sinalizador.

O etileno é um hormônio vegetal volátil com múltiplas funções fisiológicas, inclusive na comunicação entre plantas, o que o aponta como um sinalizador. Sabe-se que é produzido em resposta a ferimentos ou infecção por patógenos e a exposição à elicitores de mecanismos de defesa. Entretanto, enquanto alguns estudos mostraram que o etileno é intermediário necessário junto com o AJ para regular e expressão de genes de resistência (O'Donnel et al., 1996), outros indicam que a síntese de etileno após uma infecção deve ser um sintoma e não uma causa da indução de resposta de defesa (Sticher, 1997).

O ácido jasmônico e o etileno são sinais para resistência em um caminho que é independente do AS e do acúmulo de proteínas-RP, e onde os indutores típicos são as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal. Esta via (RSI), a exemplo de RSA, é dependente da proteína NPR1, mostrando que o AS não é o único ativador dessa proteína. Evidentemente, NPR1 regula de forma diferencial a expressão de genes relacionados à RSI ou à RSA, dependendo de como o caminho foi previamente ativado (Pieterse et al., 2001).

2.2.4 Mecanismos de defesa exibidos pela planta após a indução de resistência

2.2.4.1 Proteínas Relacionadas à Patogênese – Proteínas-RP

As proteínas relacionadas à patogênese participam ativamente no fenômeno da resistência induzida tanto quando a indução é por fatores bióticos como por abióticos. Proteínas-RP acumulam-se em locais de infecção e em sítios distantes destes (Sticher et al., 1997). Sua síntese e acúmulo possuem caráter de resposta ativa e sistêmica em caso de resistência induzida (Van Loon, 1985). Geralmente possuem potente atividade antimicrobiana *in vitro* onde é de se presumir que também a possuam *in vivo*. Podem se acumular nos espaços intercelulares quando teriam uma ação direta sobre os patógenos e também em vacúolos onde teriam ação após eventos de patogênese que culminam com a descompartimentalização (Figura 2). São solúveis em meio ácido, tem baixo peso molecular e resistem a proteases (Hogue & Asselin, 1987). Tais características são importantes na funcionalidade destas proteínas, já que estando presente no fluído intercelular, estão sujeitas a condições extremas de pH e a ação de enzimas proteolíticas resultantes do colapso de células hospedeiras e extravasamento do conteúdo dos vacúolos.

Atualmente essas proteínas são agrupadas em 17 famílias, sendo que algumas têm atividade conhecida e outras não (Van Loon et al., 2006). Proteínas-RP são enzimas que possuem atividade hidrolítica quebrando polímeros estruturais presentes na parede celular dos patógenos. Quitinases e glucanases são as mais estudadas e hidrolisam respectivamente quitina e glucana, polímeros que são componentes principais da parede celular de muitos fungos. Bactérias podem ser inibidas pela família oito de quitinases, que também possuem atividade de lisozima (Linthorst, 1991). As proteínas-RP, atuando em componentes dos fitopatógenos, ainda liberam moléculas que podem atuar como elicitores de outras respostas de defesa (Keen & Yoshikawa, 1983).

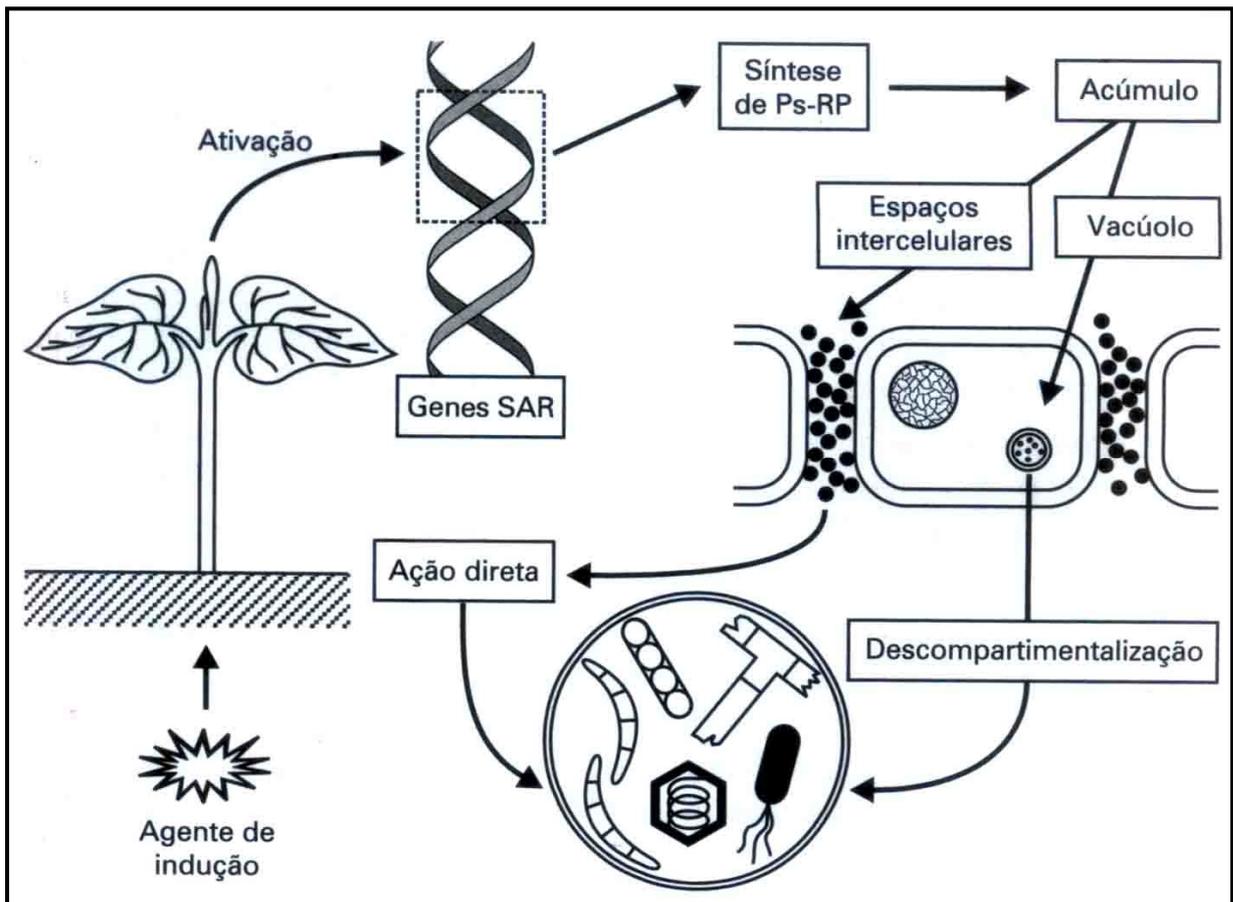


Figura 2 - Indução, gênese e modo de ação das proteínas-PR como mecanismos induzidos de defesa em plantas (Romeiro, 2008).

2.2.4.2 Fenóis

Os fenóis são produzidos pelas plantas e as enzimas envolvidas na síntese estão associadas ao retículo endoplasmático, permitindo que após sua produção esses compostos sejam armazenados em vesículas na forma original ou glicosilada (Labanca, 2002).

A compartimentalização é fundamental para o funcionamento das células, pois os fenóis são tóxicos e devem ser mantidos na sua forma reduzida. Quando a planta é submetida a qualquer tipo de estresse, estes compostos passam no interior das células de uma forma atóxica, reduzida e compartimentalizada, para uma forma tóxica e não reduzida, durante a descompartimentalização. Fenóis que se mantêm livres no citoplasma podem ter ação tóxica, tanto sobre patógenos como sobre a própria célula vegetal e contribuir para a reação de hipersensibilidade (Hrazdina, 1994).

2.2.4.3 Fitoalexinas

As fitoalexinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, antimicrobianos, sintetizados pelas plantas em resposta a infecção por microrganismos, estresse físicos e químicos, sendo fator importante na resistência de plantas ao patógeno. As fitoalexinas possuem grande diversidade, sendo que mais de 300 tipos já foram caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonóides, luteolinidina, apigenidina, apigeninidina entre outras (Cavalcanti, et al., 2005).

2.2.4.4 Produção de radicais livres (estresse oxidativo)

Os processos oxidativos desempenham uma importante função nos estágios iniciais da IR participando na sinalização e na síntese de compostos de defesa. Reações catalizadas por peroxidases que levam à polimerização de fenóis e a formação de lignina, reações catalizadas por peroxidases que levam a ligações cruzadas de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e ao fortalecimento da parede celular vegetal, e a toxidez direta dos radicais livres sobre patógenos estão relacionados a mecanismos de defesa de plantas (Labanca, 2002).

Durante o metabolismo normal da célula vegetal, o oxigênio é incorporado em moléculas orgânicas e vários compostos citotóxicos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido e radicais de oxigênio e hidroxílicos são gerados. Os radicais livres são os elementos mais tóxicos atuando principalmente sobre a membrana plasmática, mas também sobre enzimas, ácidos nucleicos e pigmentos. Nas plantas existe naturalmente uma série de mecanismos de prevenção contra os efeitos negativos do acúmulo desses radicais.

A membrana das bactérias é igualmente sensível a radicais livres, e desse modo, o estresse oxidativo é considerado como parte das estratégias de defesa das plantas na limitação da colonização pelo patógeno invasor (Eltner, 1982). A capacidade de bactérias fitopatogênicas de se multiplicarem nos tecidos da planta pode ser em parte, devido à capacidade de destoxificar o meio ao redor do sítio de infecção da presença do H_2O_2 , o qual dentre os compostos de oxigênio é o que penetra mais facilmente através da membrana, afetando uma série de processos celulares. O provável candidato para a modulação da ação de H_2O_2 é a enzima catalase, que converte H_2O_2 em H_2O e O_2 .

2.2.4.5 Lignificação e barreiras histológicas

Além do aparato bioquímico de resistência, as plantas podem reagir à invasão microbiana sintetizando substâncias que reforcem a parede celular, dificultando ou impedindo o avanço do microrganismo por um efeito puramente físico. A síntese de lignina é uma resposta de resistência da planta a invasão de patógenos, pode ser induzida por agentes bióticos e abióticos, apresenta caráter sistêmico e está associada a RSA. Ligninas são definidas como biopolímeros complexos que tem sua origem na rota fenilpropanóide pela polimerização desidrogenativa de precursores. Neste processo a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) é importante, pois promove a desaminação da fenilalanina originando ácido cinâmico, outros precursores e compostos intermediários na síntese da lignina. Inibidores específicos de FAL reduzem a resistência de plantas a doenças, possivelmente pelo impedimento da síntese dos derivados fenilpropanóides necessários à formação de lignina (Romeiro, 2008).

2.2.5 Indutores de RSI e o controle de doenças de plantas

Um dos temas mais relevantes deste início de século é a sustentabilidade, que resulta na busca pelo setor produtivo de sistemas de produção que possam conciliar alta produtividade com a redução de impactos negativos sobre o meio ambiente. Encontrar uma forma menos agressiva ao ambiente através da ativação dos mecanismos de resistência das plantas deixando que ela própria se proteja contra patógenos, por certo, será uma estratégia desejável nos anos vindouros.

Conhecido desde o começo do século passado, os primeiros trabalhos sobre o fenômeno da indução de resistência datam de 1901, em trabalhos realizados com interação *Botrytis cinerea* x *Begonia* sp. (Kessman et al., 1994). Em 1933, foi observado por Chester que as plantas normalmente suscetíveis podiam adquirir resistência contra doenças após uma infecção primária causada por patógenos ou após o tratamento com formas atenuadas de agentes patogênicos. Trabalhando com tubérculos de batata, a inoculação de uma área do tubérculo com uma raça avirulenta de *Phytophthora infestans* resultava em uma reação de hipersensibilidade e no acúmulo de fitoalexinas, o que impedia o crescimento da raça compatível nos tecidos (Pascholati & Leite, 1995).

Ross (1961), demonstrou que plantas de tabaco submetidas a uma infecção prévia com *Tobacco Mosaic Virus* (TMV- vírus do mosaico do tabaco) se tornavam resistentes a uma

nova infecção do vírus. Assim foi concebido o termo “resistência sistêmica adquirida” (RSA ou SAR), designando as respostas de defesa induzidas de forma sistêmica pela interação com fatores externos, como radiação ultravioleta, produtos químicos e estruturas de microrganismos.

Segundo Hahn et al. (1996) e Wulff & Pascholati (1998), estudos têm demonstrado que as plantas podem reconhecer carboidratos, glicoproteínas, proteínas, ácidos graxos, componentes da parede celular vegetal e induzir resposta de defesa em plantas. Wulff & Pascholati (1999) verificaram que indutores glicoprotéicos obtidos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* estimularam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Labanca (2002), também verificou que um carboidrato, possivelmente contendo manama e glucosamina, obtidos da parede celular de *S. cerevisiae* induziu resistência local em pepineiro contra *Colletotrichum lagenarium*.

O Agro-mos[®], cujo princípio ativo é representado por mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede celular de *S. cerevisiae*, é um produto que têm demonstrado efeito positivo no controle de doenças em videiras, batata e tomate quando utilizado em conjunto com fungicidas, possibilitando uma redução do número de aplicações (Di Piero et al., 2005). Dentre os mecanismos de interação antagônica utilizados por fungos e leveduras pode-se incluir a produção de enzimas hidrolíticas e antibióticos, competição por nutrientes em plantas e colonização de nichos, indução de mecanismos de defesa em plantas hospedeiras e interferência com fatores de patogenicidade do patógeno (Punja & Utkhede, 2003).

O Ecolife[®] é um produto natural proveniente da biomassa cítrica que possui na sua formulação aquosa heterogênea polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos orgânicos diluídos. Tem-se mostrado eficaz na proteção de pepino, cafeeiro, cacauzeiro e pessegueiro (Quinabra, 1996).

Avanços nas pesquisas envolvendo indução de resistência em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de produtos comerciais. Atualmente existem cinco indutores de resistência no mercado mundial: Bion[®], Messenger[®], Elexa[®], Orizamate[®] e Oxycon[®].

Acibenzolar-S-Metil (ASM), é um composto sintético análogo ao ácido salicílico. Da mesma forma que o ácido salicílico (AS), o ASM atua como ativador químico de resistência, fornecendo proteção contra o mesmo espectro de patógenos e ativando a expressão dos mesmos genes, quando comparado com a indução biológica da RSA. No entanto, o ASM não apresenta a grande desvantagem do AS, que é a de ser fitotóxico às culturas em uma dose muito próxima à necessária para induzir resistência. O ASM é considerado o primeiro ativador vegetal sintético de RSA disponível, tendo sido liberado para comercialização na

Europa com o nome de BION[®] e nos Estados Unidos como ACTIGARD[®]. No Brasil, com o nome de BION[®], o produto está registrado para as culturas do cacau, tomate e citros entre outras. Em citros é indicada no controle da bactéria *Xylella fastidiosa* agente causal da clorose variegada dos citros (CVC).

Dentre outras culturas, existem relatos do ASM induzindo resistência em trigo contra patógenos fúngicos, em feijão contra fungos e bactérias, em fumo e em *Arabidopsis* sp. contra fungos, bactérias e vírus.

O ASM tem mostrado induzir resistência contra algumas doenças onde medidas eficazes de controle são raras ou mesmo ausentes. Em tomate, por exemplo, o tratamento com ASM protegeu as plantas contra a podridão radicular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou & Belanger, 1998).

O Oryzemat[®] (probenazole) é um produto para proteção do arroz contra brusone que já conta com mais de 20 anos de mercado no Japão sem que haja um único relato de surgimento de resistência na população do patógeno, sendo também usado em algumas culturas hortícolas, mostrando-se efetivo, não só para o controle de fungos e bactérias, mas também para o controle de viroses (Koganezawa et al., 1998). O Elexa[®], além de ingredientes inertes, contém um carboidrato denominado quitosana, extraído do exosqueleto de crustáceos. O ingrediente ativo do Messenger[®] é uma proteína, produzida por um gene *hrp*, da bactéria fitopatogênica *Erwinia amylovora*. Tanto a proteína HRP como a quitosana liga-se a receptores existentes na membrana celular de plantas, mimetizando o fenômeno de reconhecimento que ocorre em uma interação compatível entre planta e patógeno. O Oxycom[®] é uma mistura de ácido peracético, ácido acético e H₂O₂. O produto é capaz de aumentar a atividade de enzimas importantes ligadas a RSA, como a fenilalanina amônia-liase (FAL), chalcona sintase e peroxidases e proteger as plantas contra nematóides e fungos (Labanca, 2002).

Outros agentes são estudados como possíveis elicitores de respostas de defesa ou indutores de resistência. Esses agentes podem ser químicos como o ácido salicílico, o ácido β-amino butírico (BABA), etefon, e o metil salicilato, ou estresse de natureza biótica ou abiótica, um patógeno avirulento, parte de um patógeno, como uma glicoproteína ou um carboidrato estrutural, um organismo não patogênico, como as bactérias promotoras de crescimento e até luz ultravioleta.

Na Flórida (EUA), a aplicação de Zn, Mn e Mg para o controle da mancha graxa, de fosfito para o controle de *Phytophthora* spp. e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) + *Bacillus subtilis* para o controle do cancro cítrico foi combinada com a aplicação de salicilato de

potássio para o controle do HLB. A esses produtos, ainda verifica-se a mistura de B, Mo, e monoamôniofosfato (MAP) para o suprimento de nutrientes às plantas, além do óleo como inseticida para o controle do psilídeo (Giles, 2009). Essa mistura é aplicada via foliar várias vezes ao ano, quando os fluxos de vegetação apresentam folhas jovens a recém maduras.

O efeito das aplicações dessa mistura no controle de outras pragas e doenças dos citros contribui para um aparente aumento na expectativa da vida produtiva das plantas afetadas pelo HLB. Atualmente, estes tratamentos são conhecidos como tratamentos nutricionais e não há evidências de redução na incidência ou severidade do HLB, mas sim uma melhor nutrição da planta afetada o que atenua temporariamente os sintomas (Mattos Jr. et al., 2010).

Pesquisadores da Flórida (EUA) tem conduzido experimentos de campo para testar a efetividade desses indutores. Até o momento os resultados são preliminares, mas apontam para um melhor enfolhamento inicial e redução dos sintomas em folhas de plantas infectadas. No entanto, essas diferenças visuais de sintomas desaparecem após 2-4 meses das aplicações (Arevalo et al., 2009). A melhoria do estado nutricional não cura a planta, somente retarda o progresso da doença numa árvore infectada. Destaca-se a necessidade de estudos detalhados para elucidar o efeito de curto prazo desses indutores em plantas tratadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é composto por dois experimentos. O Experimento I foi conduzido para fazer uma triagem e avaliar o efeito sobre a *Ca. L. asiaticus* de alguns dos principais agentes indutores com resultados positivos em outros patossistemas. O Experimento II foi conduzido para avaliar o efeito de doses daquele tratamento que se destacou no primeiro experimento. Ambos foram conduzidos sob condições similares, exceto alguns casos específicos conforme descrito na Figura 3.

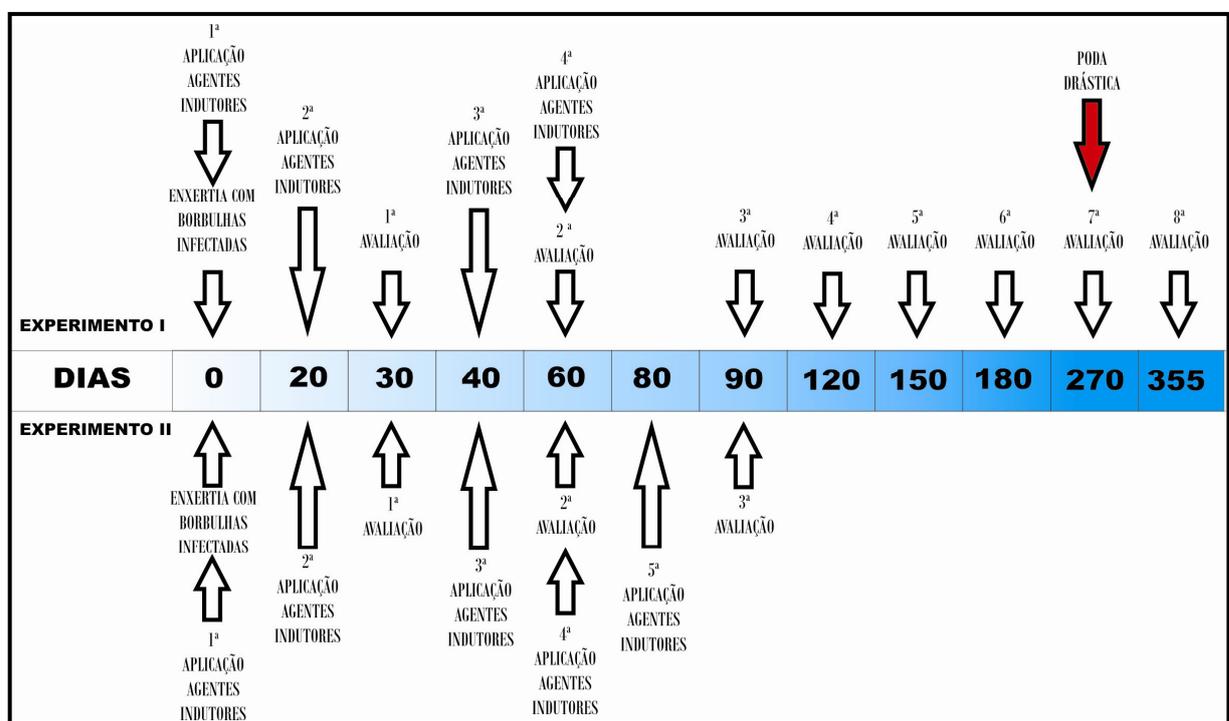


Figura 3 – Cronograma das atividades realizadas durante a condução dos experimentos. Ambos os experimentos iniciaram com a enxertia e a 1ª aplicação dos indutores. Todas as etapas de aplicação e poda estão ilustradas em relação ao número de dias após a enxertia (DAE). A poda após 7ª coleta (270 DAE) ocorreu somente no Experimento I. Cada avaliação consistiu na visualização dos sintomas nas folhas para cada planta e na coleta de três folhas por planta para a extração de DNA e PCR para *Ca. L. asiaticus*.

3.1 Plantas e fonte de inóculo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação sob telado à prova de vetores de doenças nas condições previamente descritas conforme Lopes et al. (2009).

O efeito dos produtos e moléculas sinalizadoras de resistência foi testado em mudas de laranja doce variedade 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], enxertadas sobre limoeiro cravo (*C. limonia*), com nove meses de idade. As mudas foram produzidas em sacolas plásticas de 4 litros contendo substrato constituído por casca de pínus compostada e vermiculita. Essas mudas cítricas são pré-imunizadas com uma linhagem de CTV. A irrigação foi realizada 4 vezes na semana com um volume de aproximadamente 250 mL de água por sacola, totalizando 1000 mL semanalmente. Junto com a água de irrigação, uma vez por semana, foi feito o manejo nutricional das plantas através da fertirrigação com uma solução nutritiva contendo os seguintes fertilizantes em g 1000L⁻¹ de água: nitrato de cálcio= 900, nitrato de potássio= 300, MAP= 70, sulfato de magnésio= 260, cobre-ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (14,5% Cu)= 10, Zinco-EDTA (14% Zn)= 7, Manganês-EDTA (13% Mn)= 5, Ácido Bórico= 3,5, Molibdato de Amônio= 0,3, Ferro- ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDDHA) (6% Fe)= 50.

Como fonte de inóculo foram coletados ramos com borbulhões em um pomar de laranja variedade 'Pêra', com quatro anos de idade, localizada no município de Matão-SP de ramos sintomáticos para o HLB e infectados por '*Ca. L. asiaticus*'. No Experimento I, a confirmação da presença da bactéria foi feita em cerca de 10% da casca dos ramos coletados, que foram analisados através de PCR duplex para ocorrência de *Candidatus Liberibacter* spp. (Teixeira et al., 2009). No Experimento II, tecido adjacente a cada borbulhão foi coletado e analisado como descrito acima. Desta maneira, amostra de cada dois borbulhões constituiu uma amostra para cada planta receptora (cada planta recebeu dois borbulhões).

3.2 Enxertia

O início do experimento foi marcado pela inoculação através do método da enxertia (Figura 4), descrito por Lopes & Frare (2008). Realizou-se um corte longitudinal de aproximadamente quatro centímetros em lados opostos do caule a ser inoculado, a mais ou menos cinco centímetros acima da linha de junção do porta enxerto com a copa. O corte atingiu aproximadamente 1/3 do diâmetro do caule. Em seguida, um segmento de quatro centímetros de comprimento (borbulhão), com diâmetro equivalente ao do tronco da planta a ser inoculada, foi removido do ramo sintomático (inóculo) e após corte longitudinal foi afixado na região do corte. Cada planta recebeu dois borbulhões, enxertados em lados opostos no caule. A fixação do ramo foi feito por meio de fitas de plástico transparente de dois centímetros de largura (fítio) comumente empregadas na formação de mudas em viveiros. O

fitilho foi removido do caule após a cicatrização do enxerto, 28 dias após a enxertia. O controle negativo constituiu-se de plantas enxertadas com borbulhões vindos de mudas saudáveis, como descrito acima. Após 60 dias da enxertia foi avaliado o pegamento das borbulhas e as plantas nas quais as duas borbulhas não estavam de cor verde, foram eliminadas do ensaio. A enxertia foi realizada em janeiro de 2010 no Experimento I e em dezembro de 2010 no Experimento II. Cada tratamento consistiu de 38 plantas, sendo 4 plantas como controle negativo e 34 inoculadas com borbulhões infectados por *Ca. L. asiaticus*.



Figura 4 – Transmissão via enxertia.

3.3 Indutores de resistência

Os tratamentos indutores foram aplicados através de aspersão até o ponto de escorrimento com os produtos descritos na Tabela 1. No Experimento I, as plantas receberam os tratamentos parcelados em quatro vezes e no Experimento II, parcelados em cinco vezes de acordo com a Figura 3. O controle positivo (água) foi composto de plantas não submetidas aos tratamentos, mas submetidas à inoculação. O controle negativo constituiu-se de plantas enxertadas com borbulhas saudáveis e tratadas com os agentes indutores. O primeiro tratamento indutor foi efetuado logo após a enxertia, assumindo que a transmissão de liberibacter do enxerto para a planta requer um tempo mínimo para haver a união dos tecidos da borbulha e da planta. Assume-se este tempo de união dos tecidos para considerar o tratamento indutor anterior a chegada da liberibacter na planta.

Com exceção do ácido jasmônico e do ácido salicílico, os produtos foram diluídos em água. O ácido jasmônico foi dissolvido em acetona pura e diluído em água até a concentração de 1 mM e 0,1% de acetona (Thaler, 1999). O ácido salicílico foi dissolvido em etanol puro e

Tabela 1. Quantidade de plantas tratadas com agentes indutores de resistência avaliadas após a enxertia com borbulhão de planta infectada por *Ca. L. asiaticus* nos Experimentos I e II.

Tratamentos	Quantidade de plantas avaliadas ¹
Experimento I	
Água	29
Ácido gentísico 2 mM	27
Ácido jasmônico 1 mM	29
Ácido salicílico 2 mM	28
Agromos [®] 1,5 mL L ⁻¹	29
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹	27
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹ + peróxido de hidrogênio 100 µM	27
Ecolife [®] 1,5 mL L ⁻¹	31
Metil jasmonato 2 mM	23
Peróxido de hidrogênio 100 µM	23
Acetona 0,1%	2
Etanol 15%	7
Experimento II	
Água	32
Bion [®] 0,4 g L ⁻¹	32
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹	31
Bion [®] 1,6 g L ⁻¹	32
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹ + peróxido de hidrogênio 100 µM	31

¹ – Para cada tratamento foram inoculadas 4 plantas com 2 borbulhões obtidos de plantas sadias, como controle sadio. Para cada tratamento foram enxertadas 34 plantas com borbulhões obtidos de plantas infectadas por *Ca. L. asiaticus* e o número de plantas avaliadas são plantas nas quais ao menos 1 dos 2 borbulhões teve sucesso na enxertia (vide item 3.2). Controles sadios não são somados com plantas enxertadas com borbulhões de plantas infectadas por *Ca. L. asiaticus* para efeitos comparativos entre os tratamentos. Controles sadios são empregados para comparação com enxerto de *Ca. L. asiaticus* dentro do tratamento e para avaliação do desenvolvimento das plantas em relação ao tratamento com os agentes indutores.

diluído em água até a concentração de 2 mM e etanol a 15%. Estes dois tratamentos tiveram controles adicionais para avaliar o efeito do solvente na colonização de *Ca. L. asiaticus* nas mudas de citros e para avaliação de efeito fitotóxico. Estes tratamentos controle constituem-se de 0,1% de acetona ou 15% de etanol. No Experimento I, acibenzolar-S-metil (ASM, Bion[®])

foi aplicado na dose indicada de 80 g 100L⁻¹ conforme registro para citros. No Experimento II foram testadas três doses conforme Tabela 1 para avaliar o efeito de doses do indutor. Ecolife[®] foi aplicado na dose indicada no rótulo, 150 mL 100L⁻¹ de água. Na ausência de uma indicação para citros, o Agromos[®] foi empregado na mesma dose que o Ecolife[®]. Ácido salicílico e metil jasmonato foram aplicados a 2 mM, em dose usualmente acima do indicado (Leon-Reyes et al., 2010), devido a natureza da planta teste. O ácido genticóico foi aplicado em dose similar à do ácido salicílico (Belles et al., 1999) e o peróxido de hidrogênio na dose empregada no trabalho de Polidoros & Scandallos (1999).

3.4 Avaliação das plantas

Cada planta foi avaliada individualmente, sendo coletadas duas folhas novas e uma folha velha em cada avaliação. Concomitantemente com a coleta das folhas as plantas dos experimentos foram observadas quanto ao desenvolvimento de sintomas, onde a presença de mosqueado e folhas com sintomas similares a deficiência de minerais foram registradas e fotografadas conforme a Figura 5. Esses sintomas foram caracterizados como: sem sintomas (5A), deficiência mineral (5B), deficiência de zinco (5C), mancha verde amarela (5D), mosqueado (5E), nervura amarela (5F), por serem estes os sintomas mais comuns.



Figura 5 – Sintomas foliares exibidos por plantas cítricas afetadas pela *Ca. L. asiaticus*. A – sem sintomas (SS), B - deficiência mineral (DEF), C – deficiência de zinco (Zn), D – mancha verde amarela (MVA), E – mosqueado (MOS), F – nervura amarela (NA).

A detecção da bactéria foi realizada por PCR convencional. As folhas foram lavadas e secas e a nervura central e o pecíolo foram cortados e empregados na extração de DNA. Cada amostra consistiu de 500 mg de tecido e foi empregada uma versão modificada do método CTAB (cetil trimetil brometo de amônio) de Murray & Thompson (1980), descrito por Teixeira et al. (2005).

A pureza e a concentração de DNA nas amostras foram estimadas com o espectrofotômetro Nano Drop 1000 e as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas nas análises.

A PCR convencional incluindo os dois pares de primers ou iniciadores GB1/GB3 e A2/J5, são rotineiramente usados para detecção de '*Ca. L. americanus*' (Teixeira et al., 2005) e '*Ca. L. asiaticus*' (Hocquellet et al., 1999), respectivamente. O par de primer GB1/GB3 amplifica a região 16Sr DNA, enquanto que o par de primer A2/J5 amplifica parte do β operon das proteínas ribossômicas. Os reagentes da PCR e as condições da amplificação foram descritos por Teixeira et al. (2005) e o protocolo da PCR duplex foi realizado conforme Teixeira et al. (2009). Na reação da PCR foram empregados 500 ng de DNA para cada reação. Reações de PCR para confirmação foram realizadas ocasionalmente com o DNA puro, empregando-se 1 μL na reação da PCR.

3.5 Análise estatística

Para verificar a possível ocorrência de diferenças significativas entre a frequência relativa de plantas com *Ca. L. asiaticus* submetidas aos diferentes tratamentos com indutores de resistência, foi utilizado o teste do χ^2 (qui-quadrado).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

Todas as amostras de casca dos ramos usados como borbulhas de fonte de inóculo foram positivas na PCR para *Ca. L. asiaticus* (dados não apresentados). Todas as plantas de todos os tratamentos foram avaliadas pela PCR aos 60, 180 e 355 dias após a enxertia (DAE). Em função dos resultados observados na PCR aos 60 e 180 DAE, as amostras dos tratamentos com água (controle positivo) e Bion[®] foram avaliados pela PCR em todas as coletas realizadas. Não houve amostras positivas na PCR das borbulhas de plantas sadias.

A porcentagem de plantas com a presença de *Ca. L. asiaticus* submetidas a diferentes produtos e substâncias indutoras de resistência foram analisadas em diferentes intervalos de tempo pelo teste de qui-quadrado ($P < 0,05$). Dentre todos os produtos e substâncias aplicados, nas diferentes doses e combinações não foram observados sintomas de fitotoxicidade.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que entre os três diferentes intervalos de coleta de folhas avaliados pela PCR houve uma diferença significativa entre os tratamentos testados, somente aos 180 DAE. Este padrão de resposta está relacionado à capacidade do patógeno em infectar as plantas cítricas e incrementar a sua população com o passar do tempo, resultando em uma reação positiva na PCR.

Na segunda coleta de folhas realizada aos 60 DAE, um mínimo de 3,7% e um máximo de 50% de plantas foi detectado com a bactéria *Ca. L. asiaticus*. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Li et al. (2007), Lopes et al. (2009) e Colleta Filho et al. (2009), que em condições parecidas detectaram a presença da bactéria um a três meses após a transmissão por enxertia antes mesmo de apresentarem os sintomas da doença.

Aos 180 DAE, podemos afirmar com um grau de confiança de 99,98% (valor de $P = 0,0109$) que mesmo após um esperado aumento do número de plantas infectadas (positivas na PCR), observa-se que ocorreu um efeito dos tratamentos testados promovendo uma redução da infecção de plantas frente a *Ca. L. asiaticus*. Nota-se na Tabela 2 que o Bion[®] apresentou uma porcentagem de plantas infectadas de apenas 11,1% ficando abaixo do controle positivo (27,6%) representado pela aplicação somente de água.

Tabela 2. Quantidade de plantas tratadas com agentes indutores de resistência e positivas na reação de PCR para a presença de *Ca. L. asiaticus* em relação ao número de plantas por tratamento.

Tratamentos	60 DAE ¹		180 DAE		355 DAE		Quantidade de plantas
	Las +	%	Las +	%	Las +	%	
Água	5	17,2	8	27,6	27	93,1	29
Ácido gentísico 2 mM	6	22,2	10	37,0	26	96,3	27
Ácido jasmônico 1 mM	6	20,7	9	31,0	28	96,6	29
Ácido salicílico 2 mM	5	17,9	10	35,7	27	96,4	28
Agromos [®] 1,5 mL L ⁻¹	4	13,8	12	41,4	27	93,1	29
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹ + peróxido de hidrogênio 100 µM	7	25,9	16	59,3	27	100,0	27
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹	1	3,7	3	11,1	25	92,6	27
Ecolife [®] 1,5 mL L ⁻¹	8	25,8	12	38,7	29	93,5	31
Metil jasmonato 2 mM	3	13,0	10	43,5	21	91,3	23
Peróxido de hidrogênio 100 µM	6	26,0	14	60,9	21	91,3	23
Acetona 0,1%	1	50,0	2	100,0	2	100,0	2
Etanol 15%	2	28,6	2	28,6	7	100,0	7
χ^2		9,59 ^{NS}		24,46*		4,17 ^{NS}	
P-valor		0,5676		0,0109		0,9647	

¹ DAE – dias após a enxertia. A enxertia e a 1ª aplicação de agentes indutores foram realizadas no início do experimento; Las + indica o número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* na PCR e % a porcentagem de plantas Las +; Valor não significativo (^{NS}) ou significativo (*) no teste de qui-quadrado a 5%.

O tratamento Bion[®] combinado com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ficou entre aqueles com uma alta porcentagem de plantas afetadas (59,3%). A natureza deste efeito não foi avaliada, porém pode estar relacionado com uma ação direta do peróxido sobre a molécula do ASM, no mecanismo de reconhecimento do ASM ou no processo de sinalização, anulando a expressão gênica potencialmente induzida pelo ASM.

Os tradicionais produtos indutores de resistência utilizados, inclusive nos tratamentos nutricionais na Flórida (Mattos Jr. et al., 2010), tais como o ácido salicílico e o peróxido de hidrogênio, não apresentaram efeito preventivo sobre a bactéria *Ca. L. asiaticus*. Análises preliminares indicaram a ineficiência destes produtos na cura de plantas infectadas com liberibacter (Arevalo, 2009). Ácido salicílico e ácido jasmônico, amplamente conhecidos pela sua função na ativação de respostas de defesa em outras plantas (Cavalcanti et al., 2005), não reduziram o número de plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus* (Tabela 2). Kim et al. (2009), relatam que em plantas cítricas afetadas por *Ca. L. asiaticus* houve regulação de genes associados à patogênese, embora os genes da via do ácido salicílico e jasmonatos não foram regulados. Albrecht & Bowman (2008) e Martinelli et al. (2011), citam que a infecção por *Ca. L. asiaticus* dispara respostas nas vias do ácido salicílico e ácido jasmônico, nos genes relacionados à patogênese. Fica evidente que na interação citrus-liberibacter há um conjunto de genes relacionados à resposta de defesa que são regulados, alguns com expressão induzida e outros com expressão reprimida. Sreedharan et al. (2011) observaram que *Ca. L. asiaticus* tem uma “open reading frame” (ORF) codificando uma hidroxilase de salicilato, enzima responsável pela quebra do ácido salicílico. Esta enzima é funcional em *Ca. L. asiaticus* e pode degradar diversos substratos derivados de salicilato. Assim, a regulação da expressão de resposta de defesa em citros infectados por *Ca. L. asiaticus* pode estar sob influência ativa e direta de *Ca. L. asiaticus*. Nas condições de ambiente controlado que se conduziu este experimento o ácido salicílico não reduziu o número de plantas infectadas. O mesmo pode-se dizer do ácido jasmônico e do seu derivado metil jasmonato.

Os produtos Agromos[®] e Ecolife[®] poderiam apresentar um efeito parecido com o do Messenger[®], utilizado no controle de doenças em outras culturas, que tem como modo de ação mimetizar a presença do patógeno nos sítios de infecção, evitando assim o estabelecimento de uma relação compatível patógeno-hospedeiro. No entanto, ambos não tiveram efeito sobre a infecção de *Ca. L. asiaticus* nas mudas cítricas.

O ácido gentísico, um composto fenólico que aumenta consideravelmente em plantas cítricas afetadas por HLB (Van Lelyveld et al., 1988; Hooker et al., 1993), podendo atuar como um sinalizador da resposta de defesa ou como precursor de moléculas indutoras, também não tiveram efeito sobre a infecção de *Ca. L. asiaticus* nas mudas cítricas.

Os tratamentos acetona e etanol foram incluídos somente como controles dos tratamentos a base de ácido salicílico e metil jasmonato que são insolúveis diretamente em água necessitando diluição em etanol e acetona, respectivamente. Ambos os tratamentos

tiveram 100% de plantas com a presença de *Ca. L. asiaticus*, demonstrando que o solvente não apresentou efeito na colonização de liberibacter.

Em relação à avaliação aos 355 DAE, cabe informar que as amostras analisadas são oriundas de folhas coletadas a partir de plantas que sofreram uma poda drástica (Figura 3) com o objetivo de expressar ao máximo os sintomas da doença. Observa-se na Tabela 2, um substancial aumento das plantas com incidência da bactéria e praticamente todos os tratamentos tiveram números semelhantes ao tratamento a base de água. A porcentagem média de infecção por *Ca. L. asiaticus* foi de 94,7%. Esses resultados confirmam a eficiência com que a *Ca. L. asiaticus* é transmitida via enxertia e a alta capacidade de colonizar o floema de plantas cítricas um ano após a inoculação (Lopes et al., 2009; Colleta-Filho et al., 2009). Com relação à poda drástica, a emissão de brotações novas a partir do corte, parece favorecer consideravelmente a colonização dos novos tecidos pela bactéria. Pode-se observar que até mesmo o tratamento Bion[®], que nas coletas analisadas anteriormente apresentava um número menor de plantas positivas na PCR para *Ca. L. asiaticus*, após a poda drástica saltou de 11,1% para um total de 92,6% de plantas afetadas pela doença.

A comparação entre as plantas submetidas ao tratamento com Bion[®] em relação aos demais tratamentos na sexta coleta aos 180 DAE foi avaliada pelo teste do qui-quadrado (Tabela 3). Pode-se observar que o Bion[®] foi o tratamento que mais reduziu o número de plantas afetadas e diferiu da maioria dos produtos e substâncias indutoras de resistência testadas com um nível de significância de 5%.

Conforme já discutido anteriormente, entre os maiores contrastes com a aplicação isolada do produto Bion[®] foi com as plantas submetidas ao tratamento com o próprio Bion[®] combinado com o peróxido de hidrogênio e o peróxido de hidrogênio isolado, apresentando um valor de $P= 0,0002$. O peróxido de hidrogênio ou água oxigenada (H_2O_2) por ser uma substância que apresenta uma alta capacidade reativa com outras moléculas, possivelmente tenha interagido antagonicamente com o ASM anulando seu efeito como molécula potencialmente indutora de resistência.

Tabela 3. Quantidade de plantas tratadas com agentes indutores de resistência e plantas positivas na reação de PCR para a presença de *Ca. L. asiaticus* 180 dias após a enxertia. Análise estatística com o tratamento Bion[®] 0,8 g L⁻¹ em relação aos demais tratamentos.

Tratamentos	Quantidade de plantas	Las + ¹	Porcentagem de Las + ²	P-valor
Água	29	8	27,6 AB	0,1213
Ácido gentísico 2 mM	27	10	37,0 BC	0,0259
Ácido jasmônico 1 mM	29	9	31,0 AB	0,0693
Ácido salicílico 2 mM	28	10	35,7 BC	0,0318
Agromos [®] 1,5 mL L ⁻¹	29	12	41,4 BC	0,0106
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹	27	3	11,1 A	1
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹ + peróxido de hidrogênio 100 µM	27	16	59,3 C	0,0002
Ecolife [®] 1,5 mL L ⁻¹	31	12	38,7 BC	0,0166
Metil jasmonato 2 mM	23	10	43,5 BC	0,0010
Peróxido de hidrogênio 100 µM	23	14	60,9 C	0,0002
Acetona 0,1%	2	2	100,0 C	0,0013
Etanol 15%	7	2	28,5 ABC	0,2524

¹ Las + indica o número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* na PCR;

² valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente no teste do qui-quadrado a 5%.

O Bion[®] é um composto sintético análogo ao ácido salicílico, entretanto não apresenta o inconveniente de ser fitotóxico às culturas em uma dose muito próxima a necessária para induzir resistência (Labanca, 2002; Görlach et al., 1996). Embora a dose do ácido salicílico utilizada neste experimento seja alta e de não ter causado qualquer sintoma de fitotoxicidade nas plantas após as aplicações, observa-se na Tabela 3, quando se compara o Bion[®] com o ácido salicílico há uma diferença de 11,1% para 35,7% de plantas infectadas, sendo significativa com um grau de confiança de 96,82% (P= 0,0318). O fato do ácido salicílico não ser solúvel em água e requerer uma pré mistura com etanol 15% sugere uma possível dificuldade na absorção e redistribuição do produto pela planta, sendo esta uma das diferenças com o Bion[®] que não apresentou qualquer problema relacionado à dissolução em água.

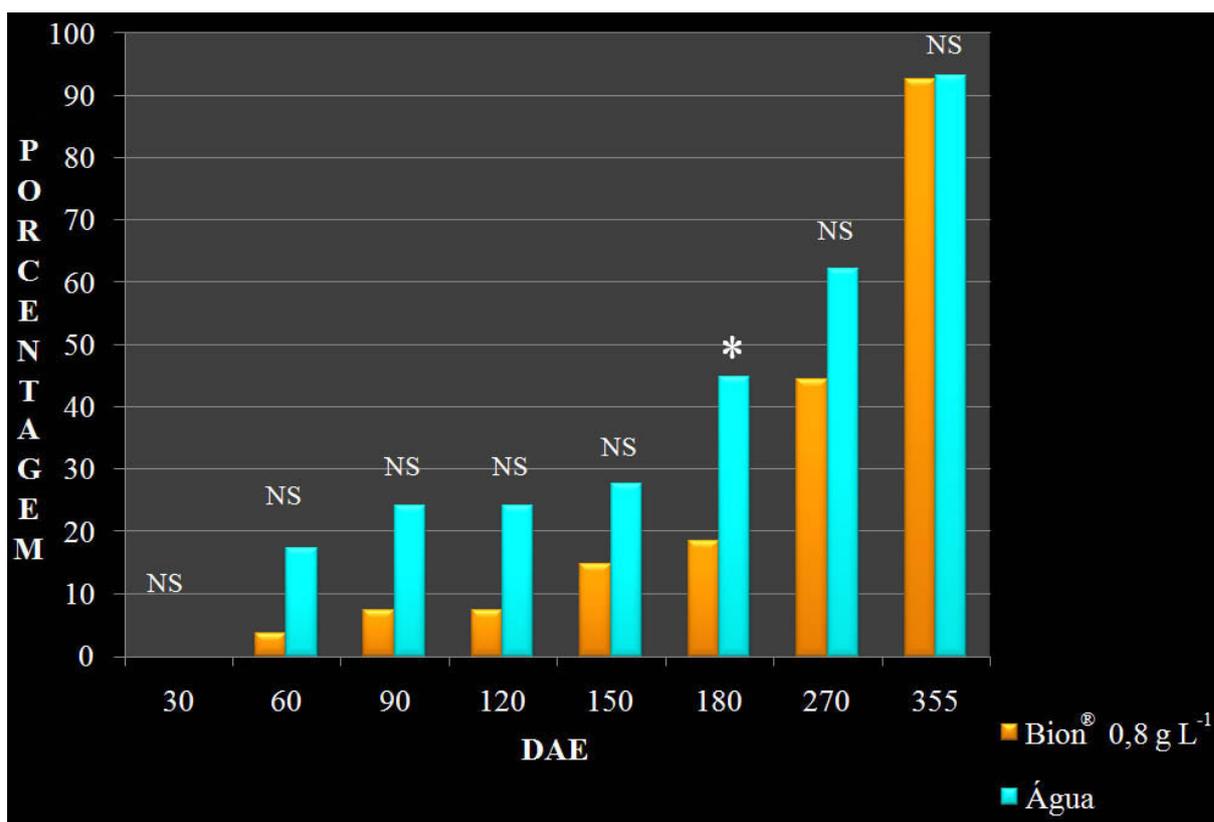


Figura 6. Incidência acumulada de plantas positivas na PCR para *Ca. L. asiaticus* nos tratamentos com Água e Bion® 0,8 g L⁻¹ nas oito avaliações realizadas no Experimento I. Valor não significativo (^{NS}) ou significativo (*) no teste de qui-quadrado a 5%.

Embora o Bion® não tenha apresentado uma diferença significativa em contraste com o tratamento controle, ácido jasmônico e controle etanol avaliados aos 180 DAE (Tabela 3), quando se considera a redução no número de plantas afetadas que se acumulou no decorrer de todos os períodos avaliados, observa-se na Figura 6, que o Bion® manteve um número baixo de plantas afetadas até a sexta coleta aos 180 DAE, e nesta avaliação apresentou um número significativamente menor de plantas infectadas por *Ca. L. asiaticus*. A partir da avaliação aos 270 DAE o acumulado de plantas aumentou significativamente apresentando ao final das avaliações um total acima de 90% de plantas infectadas. Entre a última aplicação do Bion® e a data que foi realizada a oitava coleta (355 DAE) passou-se nove meses, portanto, o aumento no acumulado de plantas positivas na PCR para *Ca. L. asiaticus* em relação ao tratamento controle, provavelmente foi influenciado pela diminuição do nível de resistência na planta em virtude da interrupção na aplicação do produto. Esses resultados indicam que o Bion® não possui um efeito preventivo diante de infecções por enxertia utilizando-se borbulhões. Seu efeito assemelha-se a um efeito bacteriostático, ou seja, paralisa sem eliminar o desenvolvimento de liberibacter enquanto houver a presença do produto na planta. Se o efeito

é direto sobre a bactéria ou sobre a ativação das respostas de defesa da planta, deve ser avaliado experimentalmente. O Bion[®] provavelmente regula genes na planta cítrica envolvidos com a produção de metabólitos de defesa que apresentam uma atividade antimicrobiana capaz de atrasar o número de infecções diante de *Ca. L. asiaticus*. O conhecimento desses genes, bem como da atividade desses compostos de defesa frente à indução por Bion[®] podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de defesa da planta que se sobrepõe aos mecanismos de virulência da bactéria.

O atraso no aparecimento de plantas infectadas no tratamento com Bion[®] sugere uma menor multiplicação bacteriana ou uma menor taxa de colonização, embora análises adicionais sejam necessárias para provar esta suposição. Cabe ressaltar que a diminuição no título bacteriano pode interferir na aquisição e transmissão da *Ca. L. asiaticus* pelo psíldeo *D. citri*. O vírus mosaico do tomate transmitido pelo pulgão *Aphis gossypii* e a *Xylella fastidiosa* em videira transmitida por cigarrinhas, são alguns dos patossistemas estudados onde a aquisição e transmissão de fitopatógenos por vetores foram incrementados pela presença da alta titulação desses agentes infecciosos nos tecidos (Escriu et al., 2000).

A Figura 7A mostra a incidência de sintomas exibidos pelas plantas submetidas à infecção por enxertia de *Ca. L. asiaticus* no tratamento com água em diferentes períodos de coleta de folhas.

Esse resultado (Figura 7A) coincide com o relatado por Lopes et al. (2009), que observaram o aparecimento dos primeiros sintomas aos 120 dias após a enxertia.

Com o passar do tempo, a bactéria é encontrada em um número maior de plantas (Tabela 2), onde há um evidente progresso dos sintomas que passam de uma leve deficiência nas folhas, manchas verdes amarelas, nervuras amarelas, evoluindo para deficiência de zinco e mosqueado (Figura 7). Colleta Filho et al. (2009), observaram uma relação direta entre a concentração do patógeno e a expressão de sintomas, sendo que folhas amareladas são geralmente o primeiro sintoma associado ao HLB e sintomas de mosqueado foram observados em plantas 180 dias após a enxertia. A Figura 7 mostra que o sintoma de mosqueado nas folhas considerado um sintoma típico e diagnóstico para a identificação da doença no campo, não foi observado com muita frequência, na verdade ele somente apareceu após a poda drástica. Esse resultado assemelha-se ao encontrado por Lopes et al. (2009), que encontrou diferenças entre a sintomatologia induzida por *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* após a enxertia, sendo que o sintoma de mosqueado foi ausente ou pouco observado nas plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus*.

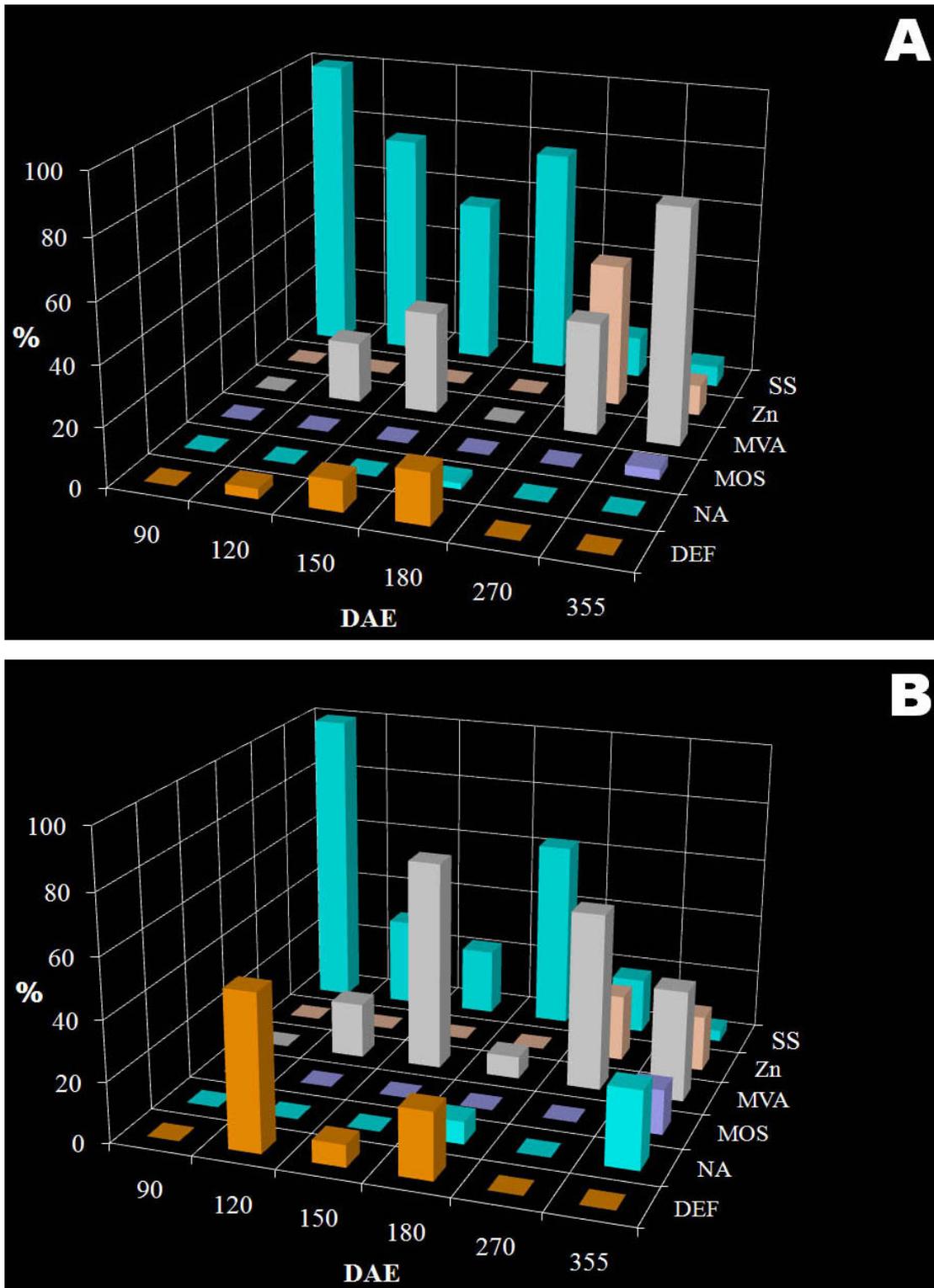


Figura 7. Incidência dos sintomas de deficiência mineral (DEF), nervura amarela (NA), mosqueado (MOS), mancha verde amarela (MVA), deficiência de zinco (Zn) ou planta sadia (SS) em função do tempo após a enxertia com borbulhas de plantas infectadas por *Ca. L. asiaticus* no tratamento com Água (A) e Bion® 0,8 g L⁻¹ (B). Antes dos 90 dias após a enxertia (DAE) todas as plantas estavam com aspecto sadio e os dados não são mostrados.

Em relação aos sintomas similares àqueles provocados por deficiências minerais, foram observados nas primeiras avaliações folhas apresentando sintomas relacionados com a deficiência de zinco, manganês e ferro e ao final predominaram as deficiências de zinco, especialmente nas duas últimas avaliações. Com relação à maior manifestação das deficiências de zinco à medida que ocorre um progresso na colonização dos tecidos do floema, o estudo do genoma da bactéria tem revelado a presença de operons para absorção de zinco, Fe^{+2} e outros minerais, indicando que esse pode ser um dos mecanismos de virulência da bactéria (Vahling et al., 2011) ou ao menos associados a sintomatologia.

A manifestação dos sintomas exibidos pelas plantas submetidas ao tratamento com Bion[®], como leve deficiência nas folhas, manchas verdes amarelas, nervuras amarelas seguidos do aparecimento de sintomas com mosqueado e deficiência de zinco também foi mantido, mesmo sendo este o tratamento que mais interferiu na taxa de infecção da bactéria *Ca. L. asiaticus* (Figura 7B).

4.2 Experimento II

Análise por PCR duplex das amostras do tecido adjacente de cada borbulha usada na enxertia para cada planta receptora, revelou uma média na presença da *Ca. L. asiaticus* em 94,9% das amostras oriundas das borbulhas de campo. Não houve amostras positivas na PCR das borbulhas de plantas sadias (dados não apresentados).

A incidência de plantas com *Ca. L. asiaticus* submetidas a diferentes tratamentos a base de Bion[®], observa-se que houve um efeito do produto na diminuição de plantas afetadas quando analisadas pelo teste do qui-quadrado (Tabela 4). Os valores de P= 0,0008 aos 30 DAE, P= 0,0149 aos 60 DAE e de P= 0,0017 aos 90 DAE revelam que o efeito do produto se estendeu para os três períodos de coleta de amostras avaliados. Na terceira e última coleta de amostras aos 90 DAE, pode-se afirmar com um grau de confiança de 99,8% que ocorreu uma diminuição na incidência de plantas com *Ca. L. asiaticus* em decorrência da aplicação do Bion[®].

O Bion[®] é um indutor de resistência reconhecido e tem sido o mais estudado para o controle de doenças bacterianas em diferentes culturas, como macieira (Momol et al., 1999), pimentão (Romero et al., 2001), algodoeiro (Ishida et al., 2008), tomateiro (Silva et al., 2003) e hortaliças em geral (Görlach et al., 1996). Sua utilização mostra-se interessante, porque é capaz de induzir resistência em plantas incapazes de acumular AS (Delaney, 1997). Dentre outras culturas, o Bion[®] conferiu proteção em plantas de tabaco contra o vírus TMV, o fungo *Cercospora nicotiana*, os oomicetos *Phytophthora tabacina*, *P. parasitica*, e as bactérias *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Friedrich, et al., 1996) e, em plantas de trigo, redução de 87% no número de lesões contra o fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (Görlach et al., 1996). Plântulas de tomate pré-tratadas com Bion[®] tiveram redução em cerca de 68% no crescimento da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente etiológico do cancro bacteriano.

A maioria dos estudos são em *Arabidopsis* sp., tabaco ou em vegetais como o tomate, com poucos estudos em plantas lenhosas como os citros. Porém, Bion[®] se mostrou eficaz em aplicações foliares para o controle de *Erwinia amylovora* em mudas de maçã e na redução do número de lesões produzidas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (cancro cítrico) em mudas de citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*) em casa de vegetação. Nos dois casos, a resposta de defesa esteve associada à síntese e manutenção de níveis de expressão adequados da PR-2 (β -1,3 glucanase) sendo considerada útil para o monitoramento da resposta do Bion[®] (Maxson-Stein et al., 2002 ; Dekkers et al., 2004).

Os dados apresentados aos 90 DAE mostram que apesar do desenvolvimento da planta, do avanço na colonização dos tecidos do floema e da diminuição dos níveis de resistência concomitantemente, o melhor tratamento reduziu em 81,2% o número de plantas afetadas em relação ao controle (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade de plantas tratadas com agentes indutores de resistência e plantas positivas na reação de PCR para a presença de *Ca. L. asiaticus*.

Tratamentos	30 DAE ¹		60 DAE		90 DAE		Quantidade de plantas
	Las +	% ²	Las +	%	Las +	%	
Água	24	75,0 C	26	81,3 D	29	90,6 B	32
Bion [®] 0,4 g L ⁻¹	14	43,8 AB	23	71,9 CD	27	84,4 B	32
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹	9	29,0 A	19	61,3 BCD	23	74,2 B	31
Bion [®] 1,6 g L ⁻¹	10	31,3 A	15	46,9 AB	16	50,0 A	32
Bion [®] 0,8 g L ⁻¹ + peróxido de hidrogênio 100 µM	18	58,1 BC	25	80,6 CD	25	80,7 B	31
χ^2		18,90*		12,35*		17,24*	
P-valor		0,0008		0,0149		0,0017	

¹ DAE – dias após a enxertia. A enxertia e a 1ª aplicação de agentes indutores foram realizadas no início do experimento; Las + indica o número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* na PCR e % a porcentagem de plantas Las +;

² valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente no teste do qui-quadrado a 5%;

A Tabela 4 mostra também o resultado da comparação entre diferentes doses de Bion[®] e a sua mistura com peróxido de hidrogênio em relação a aplicação de água, nos três períodos de coleta de folhas avaliados.

Com relação à primeira coleta de folhas, observa-se que todos os tratamentos que receberam aplicação isolada do Bion[®] diferiram da aplicação com água pelo teste do qui-quadrado a 5%. A aplicação do Bion[®] combinada com o peróxido de hidrogênio não diferiu do tratamento que recebeu somente água, corroborando o efeito observado no Experimento I. A maioria dos tratamentos nutricionais utilizados no campo tem na sua composição o peróxido de hidrogênio, o que, no caso do HLB, não tem efeito na infecção por *Ca. L. asiaticus* (Arevalo et al., 2009). O peróxido de hidrogênio além de não apresentar qualquer efeito sobre a incidência da bactéria também pode estar promovendo um efeito supressor na

atividade de outros indutores de resistência, como evidenciado no Experimento I (Tabela 2) e no Experimento II (Tabela 4).

Aos 60 DAE, os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que somente o Bion[®] 1,6 g L⁻¹ diferiu significativamente (5%) da aplicação com água. Diferentemente dos resultados apresentados aos 30 DAE os tratamentos com Bion[®] 0,4 g L⁻¹ e Bion[®] 0,8 g L⁻¹ na ocasião dos 60 DAE não diferiram da aplicação com água.

Kuhn (2007), avaliou a atividade de algumas enzimas relacionadas a indução de resistência em plantas de feijão submetidas a aplicação do Bion[®] e constatou que a atividade da peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase mostraram-se muito semelhantes mas induzidas após aplicação do indutor. Porém, decorridos 14 dias o nível de atividade retornava a valores próximos ao controle. Entretanto, quando as plantas recebiam uma nova aplicação do indutor, a atividade das enzimas aumentavam novamente. Pradhanang et al. (2005), também verificaram que quatro aplicações de manutenção com Bion[®] aumentou o nível de resistência a murcha bacteriana do tomateiro. Francis et al. (2009), constataram que o controle do cancro cítrico em mudas cítricas e uma resposta da PR-2 submetida a uma prévia aplicação foliar de Bion[®] não durou mais que 21 dias após o tratamento.

Nas condições empregadas neste experimento, o Bion[®] foi aplicado via foliar a cada 20 dias, totalizando quatro (Experimento I) ou cinco (Experimento II) aplicações e os resultados parecem indicar que o nível limite para uma resposta de defesa das plantas só serão alcançados com uma dose acima de 0,8 g L⁻¹ de Bion[®] (Tabela 4).

Observa-se que aos 60 DAE, o tratamento Bion[®] 1,6 g L⁻¹ foi aquele que apresentou a menor incidência de plantas afetadas com 46,9%, seguidos pelo Bion[®] 0,8 g L⁻¹ com 61,3% e o Bion[®] 0,4 g L⁻¹ com 71,9%, mostrando que ocorreu um efeito de doses, ou uma relação direta entre o aumento da dosagem e a diminuição de plantas afetadas pela doença (Tabela 4). O Bion[®] irrigado no solo a razão de 5 mg i.a. planta⁻¹ reduziu o número de lesões de cancro cítrico em 90% por até 16 semanas comparado a 4 semanas com 1mg i.a. planta⁻¹ via foliar (Francis et al., 2009). Osswald et al. (2004), verificaram que 5 ppm de ASM reduziu significativamente a germinação de esporos e a formação do tubo germinativo de *Colletotrichum sublineolum*, patógeno do sorgo. A inibição da formação de apressório iniciou-se com 10 ppm de ASM e, finalmente, demonstrou-se que o crescimento micelial do patógeno foi reduzido entre 50 e 80% utilizando-se 100 e 200 ppm de ASM. Dessa maneira, o ASM pode atuar como um composto fungitóxico e simultaneamente como indutor de resistência em sorgo contra *C. sublineolum*.

Uma das características usadas para se enquadrar um produto como indutor de resistência é a inexistência de atividade antimicrobiana direta do produto sobre os fitopatógenos e uma relação proporcional entre quantidade do indutor aplicado e a magnitude da resistência expressa, semelhante ao que se observa em casos típicos de uso de defensivos (Romeiro, 2008). No caso deste trabalho, para dirimir estas dúvidas bastaria correlacionar a diminuição das plantas afetadas com a atividade de algumas proteínas relacionadas com a defesa de plantas, pois o estudo do efeito direto do ASM sobre a *Ca. L. asiaticus* esbarra na impossibilidade de cultivo desta bactéria em meio de cultura.

O tratamento com Bion[®] 1,6 g L⁻¹ aplicado via foliar induziu uma alta e persistente redução do número de plantas afetadas por *Ca. L. asiaticus*, até 90 DAE (Tabela 4). Esses resultados indicam que o produto Bion[®] até o período estudado de 90 DAE, apresenta atividade no controle da infecção de plantas cítricas por *Ca. L. asiaticus*, retardando ou reduzindo seu nível de infecção, diminuindo e atrasando a detecção da bactéria.

A utilização do Bion[®] para o controle da bactéria *Xanthomonas axonopodi pv citri* em plantas de citrumelo Swingle em casa de vegetação já foi demonstrado (Dekkers et al., 2004) sendo que a captação do produto através das raízes foi superior e capaz de induzir uma sustentada resistência ao patógeno (Francis et al., 2009). Contudo, experimento em campo com variedade de laranja doce com várias aplicações foliares de Bion[®] em combinação com cobre não foram mais eficazes quando comparado com aplicação de cobre sozinho para o controle do cancro cítrico na região Sul do Brasil (Graham & Leite, 2004). A eficácia do agente indutor está relacionada com os metabólitos de defesa produzidos pela planta cítrica, que por sua vez, estão associados com a quantidade do composto fornecido para a planta. Aplicações foliares, longo intervalo entre as aplicações e aplicações em plantas adultas requerem uma compensação nas doses do produto aplicado para a manutenção de um nível apropriado de resistência. Outro fator distinto entre o cancro cítrico e o HLB é o local de colonização pelas bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. que são restritas ao floema e portanto as respostas de defesa ativadas pelo Bion[®] podem ser mais ou menos eficazes frente a liberibacter ou xantomonas dependendo do local de colonização típico destas bactérias. Kim et al. (2009) não observaram alterações marcantes em genes das vias biossintéticas do ácido salicílico e jasmonatos em plantas afetadas pelo HLB. Entretanto, foram observadas alterações em genes relacionados à proteínas-RP. Saber se há mecanismos de defesa que estão sendo ativados com o Bion[®] frente à infecção por *Ca. L. asiaticus* é uma das questões que serão abordadas na continuação deste trabalho.

A análise dos dados até os 90 DAE demonstram que o tratamento Bion[®] 1,6 g L⁻¹ foi superior na redução do número de plantas afetadas por *Ca. L. asiaticus*, indicando que houve um atraso na infecção. Entretanto, à medida que ocorre uma diminuição dos níveis de resistência na planta em decorrência da ausência de novas aplicações do produto podemos esperar uma diminuição na frequência de plantas não infectadas apresentadas pelo tratamento Bion[®] 1,6 g L⁻¹.

Esse experimento transcorreu sob condições controladas, utilizando-se para a inoculação artificial ramos sintomáticos de plantas afetadas pelo HLB. Nessas condições não foi observado qualquer efeito preventivo em decorrência da aplicação do Bion[®]. Observou-se na primeira avaliação uma incidência de no mínimo 29% de plantas (Tabela 4) e ao final do Experimento I praticamente todas as plantas estavam infectadas. O efeito do Bion[®] na infecção de *Ca. L. asiaticus* deve ser estudado em condições de infecção natural, através de psílídeos. A probabilidade do sucesso de inoculação com alta carga bacteriana pode aumentar se um número crítico de bactérias é necessário para estabelecer uma infecção (Almeida et al., 2005). Estudos conduzidos na Flórida para avaliar a aquisição e inoculação de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri* constataram que um ano após a inoculação por psílídeos, a transmissão por *D. citri* individualmente confinado em planta cítrica teve uma eficiência de 4 a 10%. Uma taxa de 88% foi observada quando um grupo de 200 psílídeos adultos foi confinado em 15 plantas. Os autores consideram que a quantidade de *Ca. L. asiaticus* requerida, muitas vezes é insuficiente para que um único psílídeo transmita e desenvolva o HLB. Abaixo de um determinado título da bactéria é possível que as plantas resistam e os mecanismos de defesa possam conferir proteção contra as infecções (Pelz-Stelinsk et al., 2010).

Até o momento estudos no patossistema HLB para determinar a titulação mínima exigida para uma inoculação eficaz não foram realizados. Contudo, os resultados apresentados neste experimento indicam que o uso do Bion[®] poderá ser promissor na indução de resistência contra infecção por *Ca. L. asiaticus*, especialmente nos casos de inoculação de menores quantidades de liberibacter do que na enxertia, como pode ser o caso na transmissão por *D. citri*. O uso do Bion[®] ou de outros indutores de resistência eficazes contra a infecção por *Ca. Liberibacter* spp. deve ser testada com a transmissão através do vetor *D. citri* e sob condições de campo antes que o seu uso no manejo do HLB seja adotado.

5. CONCLUSÃO

- Dentre os produtos e substâncias potencialmente indutores de resistência, tais como o ácido jasmônico, o ácido gentísico, Ecolife[®], Agromos[®], metil jasmonato, Bion[®] + peróxido de hidrogênio, peróxido de hidrogênio e o ácido salicílico não apresentaram efeito no controle de infecções em plantas cítricas pela bactéria *Ca. L. asiaticus*.
- O produto Bion[®] retardou o número de plantas cítricas infectadas com *Ca. L. asiaticus*, e este efeito foi dependente da dose aplicada.
- O peróxido de hidrogênio quando em mistura com o Bion[®] suprimiu a ação do Bion[®] em retardar o número de plantas cítricas infectadas com *Ca. L. asiaticus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 5th ed. p.922.
- Albrecht, U., Bowman, K.D. 2008. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. **Plant Science** 175:291-306.
- Almeida, R.P.P., Blua, M.J., Lopes, J.R.S., Purcell, A. 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate diseases management strategies. **Annals Entomology Society American**. 98: 775-786.
- Arevalo, H.A., Stansly, P.A., Rouse, R.E. 2009. Preliminary effects of insecticidal control of asian psyllid and combinations of nutrients and systemic acquired resistance elicitors on incidence of greening diseases in citrus resistance. **Pest Management Newsletter** 18:14-17.
- Bar-joseph, M. 1996. A contribution of the natural history of viroids. In: Da Graça, J.V.; Moreno, P. ; Yokomi, R.K. (Eds.). **Proceedings 13^o IOCV**. Riverside, California. pp. 226-229.
- Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Belasque Junior, J., Spósito, M.B., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Teixeira, D.C., Wulff, N.A. 2010. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**. v. 31:11-23.
- Belasque Junior, J., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Bové, J.M. Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. 2010. **Citrus Research & Technology**. 31:53-64.
- Belles, J.M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., Conejero, V. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. 1999. **Molecular Plant-Microbe Interact**. 12:227-235.
- Benhamou, N., Belanger, R. 1998. Benzothiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**. 118:1203-1212.
- Bonaldo, S.M., Pascholati, S.F., Romeiro, R.S. 2005. Indução de Resistência: noções básicas e perspectivas. 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, 263 p.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**. 88:7-37.
- Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.W. 1967. *Diaphorina citri*: a vector of the greening diseases of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**. 37: 572-576.
- Cavalcanti, L.S., Brunelli, K.R., Stargarlin, J.R. 2005. 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.
- Chester, K.S. 1933. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quarterly Reviews Biophysics**. 8:275-324.

- Coletta-Filho, H.D., Carlos, E.F., Alves, K.C.S., Pereira, M.A.R., Boscarior-Camargo, R.L., de Souza, A.A., Machado, M.A. 2009. In plant multiplication and graft transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. **European Journal Plant Pathology**. 126: 53-60.
- Cortês, H.P. 2000. Introdução aos hormônios vegetais. **Embrapa**. p. 131-157.
- da Graça, J. 1991. Citrus Greening disease. **Annual Review Phytopathology**. 29:109-136.
- Dekkers, M.G.H., Grahan, J.H., Burns, J.K., Cubero, J., Colburn, G.C. 2004. Evaluation of chemical inducers and PR protein reporters for induced systemic resistance to citrus bacterial diseases. **Phytopathology**. 94:25.
- Delaney, T.P. 1997. Genetic dissection of acquired resistance to diseases. **Plant Physiology**. 113:5-12.
- Di Piero, R.M., Garcia, D., Tonucci, N.M. 2005. 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.
- Elstner, E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual Review of Plant Physiology** 33:73-96.
- Escriu, F., Perry, K.L., Arenal-García, F. 2000. Transmissibility of *Cucumber mosaic virus* by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and is affected by the presence of its satellite RNA. **Phytopathology**. 88:1068-1072.
- Faulin, M.S.A.R. 2010. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: parâmetros bioquímicos e da produção. **Tese de Doutorado**. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo.
- Fayos, J., Belles, J.M., López-Gresa, M.P., Primo, J., Conejero, V. 2006. Induction of gentisic acid 5-O-β-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. **Phytochemistry** 67:142-148.
- Feldman, A.W., Hanks, R.W. 1969. The occurrence of a gentisic glucoside in the bark and albedo virus-infected citrus trees. **Phytopathology**. 59:603-606.
- Francis, M.I., Redondo, A., Burns, J.K., Grahan, J.H. 2009. Soil application of imidacloprid and related SAR- inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. **European Journal Plant Pathology**. 124:283-292.
- Fundecitrus. **Manual Técnico de Greening**, 2008.
- Gasparoto, M.C.G., Bassanezzi, R.B., Amorin, L., Montesino, L.H., Lourenco, S.A., Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Mariano, A.G., Martins, E.C., Leite, A.P.R., Bergamim, A. 2010. First report of 'Candidatus Liberibacter americanus' transmission from *Murraya paniculata* to sweet orange by *Diaphorina citri*. **Journal of Plant Pathology**. 92:546-546.
- Giles, F. 2009. An alternative approach. Florida Grower.
- Görlach, J., Volrath, S., Beiter-Knaut, G., Hengy, G., Beckhove, U., Heinz-Karl, K., Ootendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and diseases resistance in wheat. **The Plant Cell**. 8:629-943.

- Grahan, J.H., Leite, R.P. 2004. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. **Plant Diseases**. 38:745-750.
- Hahn, M.G. 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**. 34:387-412.
- Halbert, S.E., Manjunath, K.L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening diseases of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**. 87: 330-353.
- Hammerschmidt, R.; Kuć, J. 1995. **Induced Resistance to Disease in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic.182 p.
- Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J.M., Garnier, M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the B operon. **Molecular and Cellular Probes**. 13:373-379.
- Hogue, R.; Asselin, A. 1987. Detection of 10 additional pathogenesis-related (b) proteins in intracellular fluid extracts from stressed "Xanthinc" tobacco leaf tissue. **Canadian Journal of Botany**. 65:476, 1987.
- Hooker, M.E., Lee, R.F., Civerolo., E.L., Wang, S.Y., 1993. Reliability of genticic acid, a fluorescent marker, for diagnosis of citrus greening diseases. **Plant Disease** 77: 174-180.
- Hrazdina, G. 1994. Compartmentation in phenolic metabolism. **Acta Horticulturae**, Wageningen, 1:8693.
- Ishida, A. K. N., Souza, R. M., Resende, M. L. V., Cavalcanti, F. R., Oliveira, D. L., Pozza, E. A. 2008. Rhizobacterium and acibenzolar-S-methyl in resistance induction against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. **Tropical Plant Pathology**. 33:27-34.
- Keen, N.T., Yoshikawa, M. 1983. β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant Physiology**, 71:460-465.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**. 32:439-459.
- Kim, J.-S., Sagaram, U.S., Burns, J.K., Li, J.-L., Wang, N. 2009. Response of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**. 99:50-57.
- Koda, Y. 1992. The role of the jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **International Review of Cytology**, 135:155-199.
- Koganezawa, H., Sato, T., Sasaya, T. 1998. Effects of probenazole and saccarin in symptom appearance of tobacco mosaic virus tobacco. **Annals of Phytopathological Society of Japan**. 64:80-84.
- Kuć, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annual Review of Phytopathology**. 33:275-297.

- Kuhn, J.O. 2007. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. **Tese de Doutorado**. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo.
- Labanca, E.R.G. 2002. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). **Dissertação de Mestrado**. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo.
- Leon-Reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Körbes, A.P., Memelink, J., Pieterse, C.M.J., Ritsema, T. 2010. Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. **The American Phytopathological Society**. 23:187-197.
- Li, W., Hartung, J.S., Levy, L. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of 'Candidatus Liberibacter species' associated with citrus huanglongbing. **Plant Diseases**. 91: 51-58.
- Lin, C.K. 1963. Notes on citrus yellow shoot diseases. **Acta Phytophylact. Sin.** 2: 243-251.
- Linthorst, H.J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plant. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 10:123-150.
- Lopes, S.A., Bertolini, E., Frare, F.G., Martins, E.C., Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Fernandes, N.G., Cambra, M. 2009. Graft transmission efficiencies and multiplication of 'Candidatus Liberibacter americanus' and 'Ca. Liberibacter asiaticus' in citrus plants. **Phytopathology**. 99:301-306.
- Lopes, S.A., Frare, G.F. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to "Candidatus Liberibacter americanus". **Plant Diseases**. 92: 21-24.
- Lopes, S.A., Martins, E.C., Frare, G.F. 2006. Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em *Murraya paniculata*. **Fitopatologia Brasileira**. 31:303.
- Lopes, S.A., Martins, E.C., Frare, G.F. 2005. Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. **Summa Phytopathologica**. 31:48-49.
- Lucas, J.A. 1999. Plant Immunization: from myth to SAR. **Pesticide Science**. 55:193-196.
- Margis-Pinheiro, M., Sandroni, M., Lummerzeim, M., Oliveira, D. 1999. A defesa das plantas contra doenças. **Ciência Hoje**. 25:24-31.
- Martinelli, F., Uratsu, S.L., Albrecht, U., Reagan, R.L., Leicht, E., D'Souza, R.; Bowman, K.D., Dandekar, A.M. 2011. Deep Transcriptome Profiling of Citrus Fruit in Response to Huanglongbing Disease. Proceedings do 2nd International Research **Conference of Huanglongbing**. Orlando, FL, EUA. pp.10-14.
- Maxson-Stein, K., He, S.Y., Hammerchmidt, R., Jones, A.S. 2002. Effect treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis related protein genes. **Plant Diseases**. 86:785-790.
- Mattos Jr., D., Quaggio, J.A., Boareto, R.M. 2010. Uso de elicitores para a defesa de plantas cítricas. **Citrus Research & Technology** 31: 65-74.
- Moraes, M.G. 1998. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 6:261-284.

- Momol, M.T., Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S. 1999. Evaluation of biological control agents, systemic acquired resistance inducers and bactericides for the control of fire blight on apple blossom. **Acta Horticulturae**. 489 : 553-557.
- Murray. M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.** 8:4321-4325.
- Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **Retrato da Citricultura Brasileira**. MARKESTRAT: Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, FEA-USP, Ribeirão Preto.
- O'donnell, P.J., Calver, T, C., Atzorn, R., Masternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**. 274:1914-1917.
- Ogallo, J.L. McClure, M.A. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematodes in tomato. **Phytopathology**. 86:498-201.
- Osswald, W., Stangarlin, J. R., Nicholson, R.L., Brummer, M., Wulff, N. A., Piero, R. M., Leme, L. C. T., Hoto, F.V., Pascholati, S. F. 2004. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**. 30:415 – 420.
- Pascholati, S.F.; Leite, B. 2005. Hospedeiros: Mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H., Amorin, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. Vol. 1. Princípios e Conceitos. 3. Ed. São Paulo. Ceres.
- Pelz-Stelinsk, K.S., Brlansky, R.H., Ebert, T.A., Rogers, M.E. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psillid (Hemiptera; psillidae). **Journal Economic Entomology**. 103:1531-1541.
- Pieterse, C.M.J., Van pelt, J.A., Van wees, S.C.M., Ton, J., Léon-kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Vernhagen, B.W.M., Knoester, M., Van der sluis, I., Bakker, P.A.H.M., Van loon, L.C. 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. **European Journal Plant Pathology**. 107:51-61.
- Pradhanang, P.M., Jip., Momol, MT., Olson, SM., Mayfield, JL., Jones, JB. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. **Plant Diseases**. 89: 889-893.
- Polidoros, A. N., Scandallos, J.G. 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiologia Plantarum**. 106: 112-120.
- Punja, Z.K., Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeast to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**. 21:400-401.
- Quinabra. 1996. Boletim Técnico: Ecolife. São José dos Campos: Quinabra - química natural brasileira Ltda., 19p.
- Repka, V., Fischerova, I., Silharova, K. 2001. Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. **Vitis**. 40: 205-212.

- Romeiro, R.S. 2008. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Eds.). **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba, SP. pp. 411-429.
- Romero, A. M., Kousik, C. S., Ritchie, D.F. 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Diseases**. 85:189-194.
- Silva, R.A., Reis, V.M., Baldani, J.I., Olivares, F.L. 2008. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**. p. 49.
- Silva, L.H.C.P., Resende, M.L.V., Souza, R.M., Campos, J.R. 2003. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-S-methyl na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici*, *Septoria lycopersici* em tomateiro. **Summa Phytopathologica**. 29:244-248.
- Schwarz, R.E., Van vuuren, S.P. 1970. Centrifugal extraction of phenolic markers for indexing citrus greening and alocado sun-blotch diseases. **Phytophylactica**. 2: 65-68.
- Schwarz, R.E. 1968. Indexing of greening and exocortis through fluorescent marker substances. In: Childs, J.F.L. (Ed.). **Proceedings 4th IOCV**. Orlando, FL, EUA. pp.118-124.
- Shewry, D.R., Lucas, J.A. 1997. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. **Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology**. 26:135-192.
- Shulaev, V., Silvermann, P., Raskin, I. 1997. Methyl salicylate an airborne signal in pathogen resistance. **Nature**. 385: 718-721.
- Spletzer, M.E., Enyedi, A.J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. **Phytopathology**. 89:722-727.
- Soares, A.M.S., Machado, O.L.T. 2007. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. 1:9.
- Sreedharan, A., Wei, S., Wang, N. 2011. Differential expression of potential virulence genes of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in infected plants and psyllids. **Proceedings of 2nd International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando, FL, EUA. pp.10-14.
- Sticher, L., Mauch-mani, B., Metraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**. 35:235-270.
- Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Lopes, S.A., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Spósito, M.B., Belasque Junior, J., Bassanezzi, R.B. 2010. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**.31:115-128.
- Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Leite, A.P.R., Martins, E.C., Ayres, A.J., Bové, J.M. 2009. Identification, PCR detection and occurrence in São Paulo state, Brazil, of citrus huanglongbing-associated agents: *Candidatus Liberibacter americanus*, *Ca. L. asiaticus*, and the 16Sr group IX phytoplasma. **Tropical Plant Pathology**. 34:S7.
- Teixeira, D.C., Dane, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., Jesus Junior, W.C., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezzi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C., Bové, J.M. 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brasil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**.19:173-179.
- Thaler, J.S. 1999. Induced resistance in agricultural crops: effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato plants. **Environmental Entomology**. 25:30-37.

- Vahling, C.M., Benyon, L.S., Duan, Y.-P. 2011. Genetic and functional characterization of the *znu* operon in the intracellular citrus pathogen, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Proceedings of 2nd International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando, FL, EUA. pp10-14.
- Van Lelyveld, L.J., Van Vuuren, S.P., Visser, G. 1988. Gentisic acid concentration in healthy and greening infected fruit albedo and leaves of citrus species and cultivars. **South African Journal of Plant Soil**. 5:209-211.
- Van Loon, L.C. 1985. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**. Dordrecht. 4:111-116.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**. 114:135-162.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., L, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. 36:453-483.
- Wulff, N. A., Pascholati, S. F. 1999. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**. 24:428-435.
- Wulff, N. A., Pascholati, S. F. 1998. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**. 55:138-143.