

CLÁUDIA ALENCAR VANETTI

**RESISTÊNCIA DO TOMATEIRO A *Alternaria solani*
INDUZIDA POR QUITINA, ÁCIDO SALICÍLICO,
BENZOTIADIAZOL E ÁCIDO ACETIL
SALICÍLICO TAMPONADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T
V252r
2001

Vanetti, Cláudia Alencar, 1951-
Resistência do tomateiro a *Alternaria solani* induzida
por quitina, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil
salicílico tamponado / Cláudia Alencar Vanetti. – Viçosa
: UFV, 2001.

65p. : il

Orientador: Kiyoshi Matsuoka

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Tomate - Resistência induzida á *Alternaria solani*. 2.
Indutores de resistência em tomate. 3. Pinta-preta do to-
mateiro - Resistência induzida. 4. Pinta-preta do tomateiro
Histopatologia. 5. Tomate - Doenças e pragas - Controle.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 635.64294

CDD 20.ed. 635.64294

CLÁUDIA ALENCAR VANETTI

**RESISTÊNCIA DO TOMATEIRO A *Alternaria solani*
INDUZIDA POR QUITINA, ÁCIDO SALICÍLICO,
BENZOTIADIAZOL E ÁCIDO ACETIL
SALICÍLICO TAMPONADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 24 de novembro de 2001.

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Conselheiro)

Prof. Eldo Antônio Monteiro Silva
(Conselheiro)

Prof. Luiz Antônio Maffia

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Prof. Kiyoshi Matsuoka
(Orientador)

*A meus filhos, neto e familiares,
que, mesmo na ausência da minha atenção
e afeto, souberam compreender e me deram apoio e
coragem para continuar.*

“Pasma sempre quando acabo qualquer coisa. Pasma e desolo-me. O meu instinto de perfeição deveria inibir-me de acabar; deveria inibir-me até de dar começo. Mas distraio-me e faço. O que consigo é um produto, em mim, não de uma aplicação de vontade, mas de cedência dela. Começo porque não tenho força para pensar; acabo porque não tenho alma para suspender. Este livro é a minha cobardia.”

Fernando Pessoa, heterônimo Bernardo Soares. Livro do Desassossego, trecho 152. 1997, Editora Schwarcz.

À vida, maior mestra.
Ao tempo, maior consolo.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE QUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.1. Preparo das plantas de tomateiro, método geral de indução de resistência, método geral de inoculação de <i>Alternaria solani</i> ..	5
2.1.1. Resistência em duas espécies de tomateiro a <i>Alternaria solani</i> , induzida por quitosana, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado.....	6
2.1.1.1. Avaliação do efeito indutor de quitosana (quitina diacetilada = poli [1,4-β-D-glucosaminal]).....	7
2.1.1.2. Determinação da concentração ideal de ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) para indução de resistência .	9
2.1.1.3. Efeito comparativo de ácido salicílico (AS) e de benzotiadiazol (BTH) na indução de resistência	10

	Página
2.1.1.4. Determinação do tempo decorrido entre a aplicação do indutor e a indução de resistência por AS e BTH	10
2.1.1.5. Efeito de ácido acetil salicílico tamponado (AAS) na indução de resistência	11
2.2. Histopatologia do efeito de indutores de resistência em tomates a <i>Alternaria solani</i>	12
3. RESULTADOS	15
3.1. Resistência de duas espécies de tomateiro a <i>Alternaria solani</i> , induzida por quitosana, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido salicílico tamponado	15
3.1.1. Avaliação do efeito indutor de quitosana (quitina di-acetilada = poli [1-4-β-D-glucosanima])	15
3.1.2. Determinação da concentração ideal de ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico) para indução de resistência.....	18
3.1.3. Efeito de ácido salicílico (AS) e de benzotiadiazol (BTH) na indução da resistência.....	19
3.1.4. Determinação do tempo decorrido entre a aplicação do indutor e a indução de resistência por AS e BTH.....	20
3.1.5. Efeito do ácido acetil salicílico tamponado (AAS) na indução de resistência	21
3.2. Histopatologia do efeito de indutores de resistência em tomates a <i>Alternaria solani</i>	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Resistência em tomateiro a <i>Alternaria solani</i> , induzida por quitosana, ácido salicílico (AS), benzotiadiazol (BTH) e ácido acetil salicílico tamponado (AAS).....	43
4.2. Histopatologia do efeito de indutores de resistência em tomates a <i>Alternaria solani</i>	47
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE QUADROS

	Página
1 Eventos de pré-penetração de esporos de <i>Alternaria solani</i> em folhas de tomateiro suscetível <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller, tratado com água destilada (testemunha), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e na espécie resistente <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> introdução CNPH 417, não tratada com indutores, após 6, 24, 48 e 72 horas da inoculação.....	23
2 Número total de esporos de <i>Alternaria solani</i> em 12 fragmentos de 0,5 x 1,5 cm ² , número médio de tubos germinativos (TG) por esporo e número médio de apressórios por esporo, na fase de pré-penetração; porcentagem de penetração do fungo pelo complexo estomatal e pelo complexo epidérmico de folíolos de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller (suscetível), tratados com água destilada (testemunha), com ácido acetil salicílico (AAS), com benzotiadiazol (BTH), e de <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> introdução CNPH 417 (resistente), tratados com água destilada, após 24, 48 e 72 horas da inoculação	25
3 Número total (NT) de tipos de modificações morfológicas provocadas por <i>Alternaria solani</i> em células epidérmicas de <i>Lycopersicum hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> introdução CNPH 417, tratado com água destilada, e de <i>L. esculentum</i> cv. Miller, tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico tamponado (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), após 24, 48 e 72 horas da inoculação ..	28

- 4 Número de “ilhas de reação” e de halo grande formados distantes do sítio de penetração de *Alternaria solani*, e de células epidérmicas com ráfides formadas sob ou próximo ao sítio de penetração, em *Lycopersicon hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), tratado com água destilada, e em *L. esculentum* cv Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido salicílico (AS), benzotiadiazol (BTH) e ácido acetil salicílico tamponado (AAS), após 24, 48 e 72 horas da inoculação..... 33

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Número médio de lesões por folíolo de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller (suscetível) e <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> CNPH 417 (resistente), tratados na raiz (A), na superfície do solo (B), com injeção subepidérmica na folha (C) e com fricção com gaze (D) embebida em água destilada (0-testemunha), 0,5, 1,0 e 2,0 miligramas por mililitro de quitosona e inoculados com <i>Alternaria solani</i> . As barras sobre as colunas representam o erro-padrão da média.....	16
2 Número médio de lesões por folíolo de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller (A e C) e de <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> CNPH 417 (B e D) injetados (A e B) e friccionados com gaze (C e D) com soluções aquosas de quitosana contendo 0,0 (testemunha), 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml de quitosana, e inoculados com <i>Alternaria solani</i> . Avaliou-se o número de lesões na folha tratada, na folha imediatamente abaixo à tratada e na folha imediatamente acima à tratada. As barras sobre as colunas representam o erro-padrão da média	17
3 Número médio de lesões por folíolos de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller (suscetível) e <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> introdução CNPH417 (resistente) após tratamento com diferentes concentrações de ácido salicílico para a indução da resistência a <i>Alternaria solani</i> . Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de F, P= 0,05), entre espécies de plantas, dentro da mesma concentração	18

4	Efeito de BTH, AS e AS+BTH na indução de resistência a tomateiros <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller (suscetível) a <i>Alternaria solani</i> . Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística a 5%, pelo teste de Tukey. (Test. = testemunha).....	20
5	Número médio de lesões por folíolo de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller inoculado com <i>Alternaria solani</i> nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias após a aplicação dos indutores de resistência ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH).....	21
6	Número médio de lesões por folíolo de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller inoculado com <i>Alternaria solani</i> após tratamento com água destilada (testemunha) e os indutores de resistência ácido salicílico (AS) a 10mM, benzotiadiazol (BTH) a 1,5 mM e ácido acetil salicílico tamponado (AAS) a 10 mM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos (teste de Tukey, P = 0,05)	22
7	Número total de esporos de <i>Alternaria solani</i> presentes sobre a superfície foliar de 12 fragmentos de 0,5x1,5 cm ² de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller (suscetível) tratados com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e de <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> introdução CNPH 417 (resistente), não tratado, após 24, 48 e 72 horas da inoculação	23
8	Número médio de tubos germinativos (TGs) por esporo de <i>Alternaria solani</i> contados sobre a superfície foliar de 12 fragmentos de 0,5 x 1,5 cm ² de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Miller (suscetível), tratados com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico tamponado (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e de <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> CNPH 417 (resistente), não tratado, após 24, 48 e 72 horas da inoculação.....	24
9	Número médio de apressórios formados por esporo de <i>Alternaria solani</i> inoculado em folhas de <i>Lycopersicon esculentum</i> cv Miller (suscetível), após tratamento com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e de <i>L. hirsutum</i> v. <i>glabratum</i> introdução CNPH 417 (resistente), tratado com água destilada, após 24, 48 e 72 horas da inoculação	26

- 10 Porcentagem de penetração de *Alternaria solani* em folíolos de *Lycopersicon hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente) não tratado, e de *L. esculentum* cv. Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), após 24, 48 e 72 horas da inoculação tratados com indutores de resistência..... 29
- 11 Penetração de *Alternaria solani* , após 24, 48 e 72 da inoculação, através do complexo estomatal de *Lycopersicum hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), previamente tratado com água destilada, e *L. esculentum* cv. Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH) 30
- 12 Penetração de *Alternaria solani*, após 24, 48 e 72 da inoculação, através do complexo epidérmico de *Lycopersicum hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), previamente tratado com água destilada, e *L. esculentum* cv. Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH) 30
- 13 Fotomicrografias da penetração de *Alternaria solani* em folhas de *Lycopersicon esculentum* e *L. hirsutum* v. *glabratum*, tratadas ou não com indutores de resistência, após a germinação de esporos (es). A- via junção interclinal (je) de células da epiderme (ep) (BTH, 48 horas); B- via junção periclinal da lateral da célula-guarda (cg) e célula subsidiária (cs)(BTH, 72 horas); C- via pelo glandular (AAS, 72 horas); D- via ostíolo (o) do estômato (e)(BTH, 24 horas); E- via pelo tectônico(Miller, 48 horas); F- via extremidade ou pólo do estômato, na junção interclinal entre células-guarda e célula subsidiária (AAS, 24 horas). (a)- apressório; (h)- hifa ou tubo germinativo; (f)- hifa do fungo; (gp)- glândula do tricoma glandular; (bp)- célula-base do tricoma glandular; (em)- espessamento de parede celular da planta; (grc)- granulação do citoplasma da célula da epiderme. A barra representa 20 µm, em A, B, C, D, F, e 60 µm, em E 35

- 14 Fotomicrografias da colonização dos tecidos paliçádico e lacunoso de *Lycopersicon esculentum* por *Alternaria solani*. A- colonização da câmara subestomatal (cse) após a penetração pelo estômato. A hifa de infecção se ramifica no seu interior e invade o tecido paliçádico (pç) adjacente. As setas indicam paredes periclinais de células da epiderme presentes no plano superior da foto. (BTH, 72 horas). B. Colonização intercelular, em detalhe, do tecido paliçádico. ('Miller', 24 horas). C- colonização intercelular horizontal, a longas distâncias, de tecido paliçádico (pç). Algumas células em contato com a hifa (h) tornam-se necrosadas (pçn), azuis escuras, enquanto que várias outras ao redor adquirem coloração azulada clara, quando tratadas com azul de algodão ('Miller', 48 horas). D- colonização intercelular horizontal, a longas distâncias, do tecido lacunoso. As células em contato tornam-se necrosadas (lcn) como as paliçádicas (AS, 48 horas). A barra corresponde a 40 µm, em A, C, D, e a 20 µm, em B..... 36
- 15 Fotomicrografias das reações de modificação de parede sob forma de aposição provocadas por *Alternaria solani* inoculado em *Lycopersicon esculentum* e *L. hirsutum* v. *glabratum*. A- formação de papila (p) em resposta à presença de hifa de infecção (cabeça de seta) na junção periclinal de células da epiderme (AAS, 72 horas); B- formação de papila impedindo o desenvolvimento do fungo após formar a hifa de infecção (cabeça de seta), mas o tubo germinativo ou hifa (h) penetrou com sucesso logo em seguida, após separar as paredes (*) (AS, 48 horas). C- base de longo tricoma glandular mostrando desenvolvimento de hifa (h) septada de *A. solani* ao seu redor e tentativa de penetração após ramificação; a célula do tricoma reagiu formando papila. Parte de outro tricoma glandular (t) é visto na base da foto. (CNPH417, 72 horas). D- vista de perfil obtida na elevação da epiderme sobre nervura terciária (x) da folha, podendo-se observar o apressório (a) lançado pelo tubo germinativo, a hifa de infecção (cabeça de seta) perfurando a parede da célula epidermal e a reação da mesma sob forma de papila (pa) (AAS, 48 horas). E- formação concomitante de halo ou anel em torno de papila (h+p) formados sob apressório (a) do fungo (CNPH417, 72 horas). F- às vezes, o halo era encontrado a uma certa distância da papila. O halo geralmente se corria de azul com azul de algodão (BTH, 72 horas). (es)- esporo; (tg)- tubo germinativo. A barra corresponde a 20 µm... 37

- 16 Fotomicrografias de reações de resistência de células foliolares de *Lycopersicon esculentum* e *L. hirsutum* v. *glabratum* à infecção por *Alternaria solani*. A e B- células da epiderme superior; B e D- fotos seriadas do estômato (B) e câmara sub-estomatal correspondente (D). A- reação intensa de granulação (grc) do citoplasma e de espessamento (em) da parede da epiderme penetrada pela hifa de infecção (h), após a formação de papila (*) no local de penetração; a célula adjacente (parte superior da foto) também reagiu; as células tomam coloração dourada-amarronzada brilhante (BTH, 48 horas); B- estômato (e) aparentemente sadio deixando entrever a coloração escura (amarronzamento) e espessamento dos segmentos das paredes das células da câmara sub-estomatal (cse) voltados para o lúmen da câmara (AAS, 48 horas). C- Reação HR apresentando espessamento com forte amarronzamento da parede, granulação e acúmulo (ac) do citoplasma da epiderme que reage aprisionando a hifa de infecção (h) após a penetração paraclinal do fungo através da formação de apressório (a) (CNPH417, 72 horas. D- Nota-se nítido espessamento (em) das paredes que compõem as laterais do lúmen da câmara subestomatal, que apresentava-se dourado-amarronzado (AAS, 48 horas). (pç)- célula do paliçádico. Barra corresponde a 20 µm, em A, e a 40 µm, em B, C e D..... 38
- 17 Fotomicrografias do início da colonização do tecido paliçádico de *Lycopersicon esculentum* e *L. hirsutum* v. *glabratum* por *Alternaria solani*. A- o tubo germinativo (h) penetrou via abertura estomatal (não mostrado) e atingiu o tecido paliçádico (pç) via câmara subestomatal; as células do tecido paliçádico reagiram formando papilas paramurais (pa) (AAS, 48 horas). B- o tubo germinativo penetrou entre a lateral do estômato e a célula subsidiária (não mostrado) e colonizou intracelularmente a célula do tecido paliçádico (único caso registrado); as células do paliçádico reagiram fortemente produzindo espessamento (em) de parede (BTH, 48 horas). Barra corresponde a 20 µm..... 39

- 18 Fotomicrografias de “Ilhas de reação” formadas em células da epiderme de *Lycopersicon esculentum* e *L. hirsutum* v. *glabratum* após a inoculação em *Alternaria solani*. A- Após 72 horas, em todos os tratamentos, podiam ser observados distantes (A) ou próximos, mas não em contato com o fungo (B), halos ou anéis azuis (h), papilas (p), espessamentos de pequenos segmentos de parede (em), ráfides de oxalato de cálcio (r) e até espessamento de parede das células-guarda (seta) de estômatos (e). (A= ‘Miller’; B= CNPH 417), (es)-esporo, (dupla seta)- espessamento da parede da câmara subestomatal. A barra representa 40 μm 40
- 19 Fotomicrografias de halos grandes (azuis em reação ao corante azul de algodão) formados distantes do ponto de penetração de *Alternaria solani* em epidermes foliulares de *Lycopersicon hirsutum* v. *glabratum* (A) e *L. esculentum* (B e C). A- tubo germinativo (h) tenta penetrar (*) entre junção periclinal de células da epiderme (ep) e pela lateral do estômato (e), depois de formar apressório (a). As células afetadas reagem formando espessamento de parede (em), e um grande halo azul [(hg) e cabeças de seta] é formado envolvendo, à distância, os pontos de tentativa de penetração (CNPH417, 72 horas). B- hifas grossas e septadas (h) são formadas na superfície da epiderme (ep) e nota-se a presença de um halo grande azul envolvendo a região de tentativa de penetração paraclinal da epiderme (‘Miller’, 72 horas). C- tentativa de penetração de uma das células-guarda do estômato (e), com formação de apressório (a) sobre um dos polos do estômato; a célula-guarda afetada reage necrosando e duas células subsidiárias tornam-se granuladas (ge) apresentando, em seu interior, grânulos azuis-escuro e espessamento de parede. Um grande halo azul é observado equidistante ao ponto de penetração. Uma célula do paliçádico (base da foto à direita) torna-se necrosada (‘Miller’, 72 horas). A barra corresponde a 40 μm 41

- 20 Fotomicrografia de cristais de oxalato cálcio sob forma de ráfides, em *Lycopersicon esculentum*, e de drusas, em *L. hirsutum* v. *glabratum*, em folhas inoculadas com *Alternaria solani*. A, B e C- as ráfides só foram encontradas em folhas de *L. esculentum* e, D- as drusas, em forma de minúsculos grãos de areia, eram encontradas em *L. hirsutum* v. *glabratum*, tanto em idioblastos quanto dispersas no citoplasma. A.- 72 horas depois da inoculação, as hifas ou tubos germinativos (setas) desenvolviam-se na superfície das células da epiderme (ep), acompanhando o relevo dos feixes de ráfides (r), mais tarde penetrando, através de apressório (a), em local livre de ráfides (BTH, 72 horas). B- após 48 horas, o tubo germinativo torna-se espessado (seta), acompanhando o relevo das junções de células epidermais e tenta penetrar (a), sem sucesso, pela lateral do estômato (e), sobre um conjunto pré-formado de ráfides ('Miller', 48 horas). C- 72 horas depois de inoculadas, as células do tecido paliçádico (pç) e da câmara sub-estomatal (cs) abaixo do estômato atingido apresentam-se repletas de ráfides (r), podendo-se observar, também, espessamento de parede da câmara sub-estomatal (seta) e necrose de uma célula do paliçádico (escura). O fungo não colonizou esta região do paliçádico ('Miller', 72 horas). D- drusas (d) e idioblastos (i) encontrados constitutivamente em *L. hirsutum* v. *glabratum* (CNP417, 24 horas). (x)- xilema. A barra representa 40 μm em A, B e C, e 60 μm , em D..... 42

RESUMO

VANETTI, Cláudia Alencar, D.S. Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2001. **Resistência do tomateiro a *Alternaria solani* induzida por quitina, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado.** Orientador: Kiyoshi Matsuoka. Conselheiros: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Eldo Antônio Monteiro da Silva.

Avaliou-se a eficiência de diferentes indutores de resistência nas espécies de tomateiro *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (suscetível) e *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente) ao agente etiológico da “pinta preta” do tomateiro, *Alternaria solani*. Os indutores de resistência testados foram quitosana, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado. Verificou-se que somente o ácido salicílico e o benzotiadiazol foram capazes de induzir resistência. Em todos os ensaios, a espécie resistente apresentou um número médio de lesões por folíolos inferior ao da espécie suscetível, tratada ou não tratada. O número médio de lesões por folíolos apresentados pela espécie resistente não foi, em nenhum dos ensaios, afetado por quaisquer tipos de indutores de resistência. Realizou-se a histopatologia comparativa da interação hospedeiro suscetível x *A. solani*, tratado ou não com os indutores de resistência ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado e da interação hospedeiro resistente x

A. solani, não induzido. Coletaram-se os materiais para exame 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Este estudo foi realizado com o material diafanizado em cloral hidratado saturado. Verificou-se que as substâncias indutoras de resistência interferiram na adesão foliolar dos esporos e, ou, tubos germinativos, reduzindo o número médio de lesões de esporos nas primeiras 48 horas. Em CNPH 417, observou-se que o número médio de lesões era menor até o último intervalo estudado, de 72 horas. As barreiras morfológicas observadas por contraste diferencial de interferência Nomarski, como modificações de paredes, modificações citoplasmáticas e modificações morfológicas observadas em pontos distantes aos do sítio de penetração, de modo geral, foram as mesmas observadas na testemunha. Entretanto, o contraste diferencial não fornece nenhum indicativo sobre a composição química das barreiras. Portanto, é possível afirmar que, apenas como estruturas físicas, as modificações estruturais da parede e do citoplasma não foram eficientes para reduzir a penetração do fungo e não diferiram entre plantas induzidas e testemunha, embora pudessem apresentar efeito de retardamento da penetração e da colonização.

ABSTRACT

VANETTI, Cláudia Alencar, D.S., Universidade Federal de Viçosa, November 2001. **Resistance of tomato to *Alternaria solani* induced by chitin, salicylic acid, benzothiadiazol, and buffered acetylsalicylic acid.** Adviser: Kyioshi Matsuoka. Committee members: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Eldo Monteiro da Silva.

The synthetic chemicals chitosan, salicylic acid, benzothiadiazol and buffered acetyl salicylic acid were evaluated as inducers of resistance to *Alternaria solani* in *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (susceptible) and *L. hirsutum* var. *glabratum* CNPH 417 (resistant). The treatments with salicylic acid and benzothiadiazol reduced lesion numbers in susceptible tomato. There was no additional effect of the chemical treatments in reducing lesion numbers in the resistant species. Chitosan and buffered acetylsalicylic acid were ineffective as resistance inducers. For histological study, leaflets of susceptible tomato *L. esculentum* cv. Miller were treated with salicylic acid, buffered acetylsalicylic acid or benzothiadiazol, and sample tissues were cleared in chloral hydrate and examined by differential interference contrast microscopy. The chemical treatments reduced numbers of spore and of germ tubes attached to the cell epidermis. Cytoplasmic aggregation, changes in the cell wall and other modifications of the host cell were also observed. These

modifications might contribute as structural defense mechanisms impeding host cell penetration and retarding fungal growth. No differences in frequency were found in treated and nontreated tomato tissues. However, these structural modifications as inducing mechanisms of resistance cannot be discarded yet since further clarifications are needed, such as those provided by cytological and biochemical studies.

1. INTRODUÇÃO

A pinta preta do tomateiro, doença causada pelo fungo *Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Groul, limita a produção do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), em todas as regiões em que é cultivado (Jones, 1991). O fungo ataca toda a parte aérea da planta, causando lesões de aspecto concêntrico e enegrecidas. Em condições de alta temperatura e umidade, a taxa de progresso da doença é alta e pode destruir toda a cultura. As lesões são maiores nas folhas mais velhas do que nas mais jovens (Araújo, 2000). O aumento de suscetibilidade das folhas a *A. solani* está relacionado com o envelhecimento das plantas, o que sugere um possível papel de alcalóides (Sinden *et al.*, 1973). Além de provocar perdas severas diretamente na cultura, verificou-se que *A. solani* e outras espécies do gênero, quando infectam frutos, produzem as toxinas alternariol monometil éter (AME) e alternariol (AOH) (Motta e Soares, 2000). A AOH é letal a fetos de ratos a 100 mg/kg e AME é mutagênica e carcinogênica.

O controle da doença é feito por meio de fungicidas protetores (Zambolim *et al.*, 1990 e 1993). Em épocas quentes e chuvosas, quando a doença é mais severa, o controle químico é pouco eficiente (Maieiro *et al.*, 1990), não sendo conhecidos cultivares de tomateiros com resistência completa. Estudos sobre a resistência de tomateiro à pinta preta demonstram

que a herança é quantitativa, com envolvimento de fatores genéticos aditivos e epistáticos (Maieiro *et al.*, 1990; Stancheva, 1992; Stancheva e Milanova, 1993), de baixa a moderada herdabilidade (Nash e Gardner, 1988), o que dificulta o melhoramento visando à resistência.

Entretanto, segundo Tuzun (2001), todas as plantas dispõem de mecanismos de resistência a pragas e doenças, que podem ser induzidos ou ativados após o pré-tratamento com uma série de organismos ou compostos ativadores, fenômeno conhecido por resistência induzida sistêmica (RIS). Esses mecanismos podem-se expressar como barreira física (papilas, halos, calose, lignificação de parede) e, ou, química existentes antes de as plantas serem atacadas, denominadas barreiras constitutivas (Sticher *et al.*, 1997 e Tuzun, 2001). Quando essas barreiras são ativadas durante ou após o ataque dos invasores, são chamadas de resistência induzida ou adquirida (Sticher *et al.*, 1997). Pelo menos em certas espécies de plantas, a RIS depende do acúmulo temporal de produtos de múltiplos genes, tais como enzimas hidrolíticas, peroxidases e, ou, outros produtos relacionados com a defesa da planta a agressores externos (Tuzun, 2001).

Basicamente, na resistência induzida (RI), é aplicado um ativador da resistência de origem biótica ou abiótica. Depois de determinado intervalo de tempo, que varia de horas a dias, dependendo da interação hospedeiro x patógeno, a planta então é desafiada com o patógeno objeto de estudo ou controle.

A quitosana, quando aplicada exogenamente, ativa a produção de proteínas pelas plantas, que são hidrolases como as quitinases (Benhamou e Thériault, 1992). As quitinases, enzimas que hidrolisam quitina, são amplamente encontradas em muitos organismos (Arakane *et al.*, 2000). Especialmente em plantas, as quitinases são constitutivas e estão presentes sob diferentes isoformas, cada uma com diferentes capacidades de defesa, dependendo do domínio catalítico (Arakane *et al.*, 2000; Tsujibo, 2000). São encontradas em tecidos ou órgãos especiais, tais como: sementes, tubérculos e

órgãos florais, e respondem ao ataque de fitopatógenos e ao contato com quitina e oligossacarídeos de quitosanas.

Considerando a ausência natural de quitina em plantas, as quitinases de plantas são consideradas enzimas de autodefesa (PR-proteínas) contra patógenos e pragas que contêm quitinas. As plantas podem reconhecer quitina ou quitosana na parede celular do patógeno, produzir e secretar diferentes quitinases, dentre elas alguma específica que possua eficiência lítica ao patógeno (Arakane *et al.*, 2000). A quitinase, ao agir sobre a quitina das paredes de fungos, liberaria oligômeros (elicitores) que seriam reconhecidos por receptores presentes na membrana celular da planta, dando início aos processos de reconhecimento e de resistência, que podem ser químicos, com a produção de fitoalexinas, peroxidases, calose (Dempsey *et al.*, 1999) e, ou, físicos, como o espessamento de parede, as aposições e as papilas (O'Connell *et al.*, 1990; Hächler e Hohl, 1984; Donofrio e Delaney, 2001).

Em 1979, White observou que plantas de fumo, quando tratadas com AS, apresentavam maior resistência ao vírus TMV e acumulavam maior quantidade de proteínas PR, como quitinases e β -1,3-glucanases. Vários estudos posteriores confirmaram o resultado (Bowles, 1990).

O ácido acetil salicílico (AAS), por hidrólise, dá origem ao ácido salicílico (Mitchell *et al.*, citados por Raskins, 1992). A hidrólise é catalisada pela enzima acetil esterase encontrada na maioria dos organismos vivos. Portanto, o AAS deve causar o mesmo efeito de AS quando aplicado às plantas (Raskins, 1992; White, 1979).

O BTH é outro indutor de resistência em várias plantas, incluindo trigo, arroz, fumo e pepino (Benhamou e Bélanger, 1998a). Foi desenvolvido, sob o nome comercial de BION, pela companhia Syngenta, com a finalidade de controlar *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, em trigo (Benhamou e Picard, 2000). Desenvolvido como substituto não-fitotóxico de AS, BTH, entretanto, não depende da produção nem da presença de AS para atuar como indutor (Oostendorp *et al.*, 2001). Em trigo, o BTH é um indutor de resistência mais

potente do que o AS (Görlach *et al.*, 1996). Não se conhece, ainda, a via de ação do BTH (Oostendorp *et al.*, 2001).

Este trabalho objetivou comparar o potencial de quitosana, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado como indutores de resistência à pinta preta do tomateiro, bem como verificar, utilizando a microscopia de luz, a existência de alterações morfológicas diferenciadas entre os efeitos causados pelos indutores ácido salicílico, benzotiadiazol e por ácido acetil salicílico tamponado na interação *A. solani* x *L. esculentum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das plantas de tomateiro, método geral de indução de resistência, método geral de inoculação de *Alternaria solani*

Foram usadas as espécies *Lycopersicon esculentum* cultivar Miller, como hospedeiro suscetível, e *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417, como hospedeiro resistente. Utilizaram-se espécies diferentes pela não-disponibilidade de fontes de *L. esculentum* com alto grau de resistência a *Alternaria solani* (Castro, 1997). Embora *L. hirsutum* não apresente resistência completa, revela alto grau de resistência quantitativa (Nash e Gardner, 1988a,b).

Os tomateiros foram semeados em solo: areia: esterco, na proporção 1:1:1 e, posteriormente, transplantados para vasos plásticos de 13 cm de diâmetro por 11 cm de altura ou 15 x 13 cm. As plantas foram adubadas com NPK (4:14:8), sempre que necessário, até 15 dias antes de tratadas com os indutores de resistência. Usou-se enxofre para o controle de oídio, evitando-se sua aplicação em intervalo inferior a 10 dias da inoculação com *A. solani*.

Em plantas fisiologicamente maduras (Rotem, 1994), aplicaram-se as soluções aquosas de indutores nas concentrações decididas previamente para cada ensaio, em todas as folhas de cada planta, até o ponto de escoamento,

com De Vilbiss acoplado à bomba compressora ajustada para 1 kg/cm³. As plantas permaneceram em casa de vegetação até à inoculação.

O isolado usado foi o UL11 CM5, mantido no laboratório em tubos de ensaio que continham batata, dextrose e ágar (BDA) inclinado, em condições de ambiente. O isolado é uma variante de um isolado obtido do campo, com capacidade de esporular no escuro, a 25°C, quando semeado em placas de Petri com meio BDA modificado (200 gramas de batata, 10 gramas de dextrose e 15 gramas de ágar-ágar) ou com meio BSA (200gramas de batata, 10 gramas de sacarose e 15 gramas de ágar). A concentração de esporos usada foi de 2,5 x 10³ esporos/ml, pelo método de contagem de esporos por gota de 10 µl. Depois de inoculadas com o uso de DeVilbiss acoplado à bomba compressora, as plantas foram mantidas em câmara-de-nevoeiro ajustada para aspergir água a intervalos de meia hora e com fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de 25°C. Após 48 horas, eram novamente transferidas para casa de vegetação, até à visualização das lesões.

Dividiu-se Material e Métodos em duas partes: i- determinação dos indutores de resistência a *A. solani* em 'Miller' e ii- histopatologia comparativa de modificações morfológicas da resistência induzida na espécie suscetível em 'Miller' à resistência inerente CNPH 417.

2.1.1. Resistência em duas espécies de tomateiro a *Alternaria solani*, induzida por quitosana, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado

Os testes foram realizados em casa de vegetação e o delineamento estatístico empregado em todos os ensaios foi o inteiramente casualizado.

2.1.1.1. Avaliação do efeito indutor de quitosana (quitina di-acetilada = poli [1,4-b-D-glucosamina])

A quitosana é derivada da quitina que compõe cerca de 90% da casca de crustáceos. É um polímero policatiônico de β -1,4-glucosamina que tem a propriedade de reagir rapidamente com as cargas negativas de moléculas expostas na parede celular da planta (Benhamou e Picard, 2000).

Soluções aquosas de quitosana extraída de casca de caranguejo (Sigma, C-3646), segundo o método empregado por Benhamou e Thériault (1991), foram sempre preparadas no dia da aplicação, nas concentrações de 0,0, 0,5, 1,0 e 2,0mg/ml. A quitosana estimula a formação de quitinase ácida, em plantas, somente quando aplicada sobre ferimentos. Quando aplicada sem ferimento, tem apenas ação antifúngica de contato (El Gahouth *et al.*,1992). Por isso, usaram-se diferentes métodos no tratamento de plantas de tomate com a quitosana, para selecionar o mais adequado:

i. **Imersão de raízes-** Mudas com 18 dias após a semeadura (a espécie resistente apresentava três folhas e o cultivar Miller, quatro folhas) foram retiradas da sementeira. As raízes, após lavadas em água corrente para retirar resíduos de solo, foram imersas em frascos de 200ml que continham 100ml de cada concentração da solução, em grupos de 10 mudas por frasco, durante 30 minutos. Após esse tempo, as mudas tratadas foram plantadas individualmente em vasos e mantidas em condições de casa de vegetação. Como testemunha, as raízes de 10 mudas foram imersas em 100ml de água destilada.

Cinco dias após o tratamento, as plantas foram inoculadas com $2,5 \times 10^3$ esporos/ml e, 72 horas após a inoculação, avaliou-se o número de lesões/cm²/folíolo, sendo cinco folíolos/folha, duas folhas por planta e 10 plantas por tratamento, cada planta constituindo uma repetição.

Para delimitar a área de 1cm², usou-se um molde vazado com um retângulo de área de 1 cm². O molde foi apostado às regiões apical, mediana e basal de

cada folíolo. As lesões eram contadas, obtendo-se, posteriormente, a média de lesões/cm² /folíolo.

i.i. Solução de quitosana aplicada diretamente na superfície do solo - As raízes de mudas de tomate 'Miller' e CNPH 417, plantadas em vasos individuais, 37 dias após a semeadura, foram feridas, inserindo-se uma espátula de aço inoxidável de 2 cm de largura diretamente no solo, em oito pontos equidistantes do caule, sendo quatro pontos a 3 cm e outros quatro pontos a 5 cm de distância do coleto. Em seguida, foram distribuídos 10 ml da solução de quitosana correspondente a cada tratamento (0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml), na superfície do solo de cada vaso. Depois de tratadas, as plantas foram irrigadas para melhor percolação e distribuição da solução de quitosana no solo. Foram usadas 10 plantas para cada tratamento.

Dois dias após o tratamento, as plantas foram inoculadas e, quatro dias após a inoculação, contou-se o número de lesões, na quarta folha totalmente desenvolvida contada de cima para baixo. Obteve-se a média do número total de lesões por folíolo, contando-se o número de lesões presentes em cada cinco folíolos por folha completa, uma folha completa por planta.

Utilizaram-se 10 plantas por tratamento, cada planta constituindo uma repetição.

i.i.i. Injeção subepidérmica- Folíolos de plantas 'Miller' e CNPH 417, aos 39 dias da semeadura, foram tratados com injeção subepidérmica de 0,5 a 1,0 ml de solução de quitosana na concentração correspondente a 0,0, 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/ml, em um dos folíolos medianos da terceira folha completamente desenvolvida, do ápice para a base. Um dia após o tratamento, as plantas foram inoculadas e, após 4 dias, contou-se o número médio de lesões por folíolo, cinco folíolos por folha, nas folhas que tiveram o folíolo injetado com a solução; o número médio de lesões na folha imediatamente acima à injetada; e o número médio de lesões na folha imediatamente abaixo à injetada. Foram usadas cinco plantas por tratamento. Cada planta constituiu uma repetição.

i.v. Gaze embebida em solução de quitosana.-A terceira folha completa, a contar de baixo para cima, de plantas 'Miller' e CNPH 417, com 40 dias da semeadura, foi levemente friccionada com gaze embebida em solução de quitosana (0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml) com carborundum. Logo em seguida, a mesma folha foi aspergida com a solução correspondente, até o ponto de escorrimento. Decorridas 24 horas, toda a planta foi inoculada e, quatro dias depois, contou-se o número médio de lesões por folíolo, sendo cinco folíolos por folha, nas folhas que tiveram o folíolo friccionado com gaze embebida na solução; o número médio de lesões na folha imediatamente acima à tratada; e o número médio de lesões na folha imediatamente abaixo à tratada. Foram usadas cinco plantas, por tratamento, constituindo cada planta uma repetição.

2.1.1.2. Determinação da concentração ideal de ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico) para indução de resistência

Em todos os testes, usou-se ácido salicílico (AS), da Sigma (S-0875). Tanto o preparo da solução aquosa quanto o modo de aplicação foram semelhantes aos usados por Weymann *et al.* (1995), isto é, o ácido salicílico foi dissolvido em água destilada, por meio de agitação constante. A solução era sempre preparada no momento de ser utilizada.

Soluções aquosas de AS foram preparadas nas concentrações de 0,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mM e pulverizadas em todas as folhas das plantas 'Miller' e CNPH 417, aos 35 dias da semeadura, usando-se DeVilbiss acoplado à bomba compressora, até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. Após 48 horas, foram transferidas para a câmara-de-nevoeiro, onde foram inoculadas e mantidas em 25°C. Dois a três dias após a inoculação, contou-se o número de lesões por folíolos, sendo cinco folíolos de uma folha completa situada no terço inferior da copa, num total de 10 plantas por tratamento. Cada planta constituiu uma repetição.

Todo o ensaio foi repetido três vezes.

2.1.1.3. Efeito comparativo de ácido salicílico (AS) e de benzotiadiazol (BTH) na indução de resistência

Usou-se o benzotiadiazol (BTH) (BION, 50% p.a., Syngenta). A concentração de 1,5 mM e a forma de preparação de BTH seguiram as adotadas por Benhamou e Bélanger (1998a,b). Com base nos resultados do ensaio de determinação de concentração de AS na indução de resistência (item 2.1.2), decidiu-se pela aplicação de solução aquosa de AS a 10 mM.

Os tratamentos consistiram em aplicação de água destilada (testemunha), AS, BTH e AS + BTH. O tratamento conjunto de AS + BTH, o BTH foi aplicado logo em seguida ao AS. Foram usadas apenas plantas da espécie suscetível, *L. esculentum* cv Miller.

As plantas foram tratadas 53 dias após a semeadura. Após 48 ou 72 horas de tratadas, foram inoculadas com o fungo. Quatro dias após a inoculação, contou-se o número de lesões por folíolo, sendo cinco folíolos em cada folha do terço inferior da copa, duas folhas em cada planta, sendo calculado o número médio de lesões por folíolo, por planta. Foram usadas cinco plantas por tratamento, representando cada planta uma repetição.

O ensaio foi repetido duas vezes.

2.1.1.4. Determinação do tempo decorrido entre a aplicação do indutor e a indução de resistência por AS e BTH

O ensaio foi realizado para determinar o tempo necessário para que ocorresse a indução da resistência nas plantas, após a aplicação do(s) indutor(es).

A copa das plantas da cv. Miller foi tratada com pulverização individual das soluções de AS 10 mM e, ou, BTH 1,5 mM, em intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias antes de serem inoculadas com o fungo. A testemunha foi tratada com água destilada e inoculada, em seguida, com *A. solani*.

Contaram-se os números de lesões em cada folíolo de duas folhas completas do terço inferior de uma mesma planta, sendo cinco folíolos por folha. A média de lesões por folíolo de cada planta consistiu em uma repetição, tendo sido usadas cinco plantas por tratamento.

Todo o ensaio foi repetido duas vezes.

2.1.1.5. Efeito de ácido acetil salicílico tamponado (AAS) na indução de resistência

Durante os trabalhos, observou-se que o AS era tóxico às folhas dos tomateiros. O ácido acetil salicílico é transformado em AS pelo efeito de acetil esterase produzida pelos organismos vivos (Mitchell *et al.*, citados por Raskins, 1992), inclusive pelas plantas. Sendo o pH do AS extremamente baixo, em torno de 2,2, e provável causador da fitotoxidez, decidiu-se usar o ácido acetil salicílico (AAS) tamponado (pH 3,9-4,0) com carbonato de cálcio, óxido de magnésio e carbonato de magnésio, encontrado comercialmente com o nome de Bufferin (Bristol-Myers Squibb Brasil), numa tentativa de evitar as lesões provocadas pelo AS.

O comprimido de AAS foi triturado em almofariz e diluído em água destilada imediatamente antes de ser usado.

Os tratamentos consistiram na aplicação de água destilada (testemunha), AS (10 mM), BTH (1,5 mM) e AAS (10 mM), na copa de plantas do cv. Miller. Depois de três dias, inoculou-se *A. solani* e, 48 horas após, foi avaliado o número médio de lesões por folíolo de duas folhas completas do terço inferior da copa. Usaram-se cinco plantas por tratamento, representando cada planta uma repetição.

2.2. Histopatologia do efeito de indutores de resistência em tomateiros a *Alternaria solani*

Tomateiros do cultivar Miller e da introdução CNPH 417 foram semeados em mistura de solo: areia: esterco (1:1:1) e mantidos em casa de vegetação. Depois de 15 dias, foram transplantados, individualmente, para vasos de 15 x 13 cm e adubados uma vez com mistura NPK na proporção 4: 14: 8. Foram usadas três plantas por tratamento.

Aos 56 dias da semeadura, as plantas da cv. Miller foram tratadas com ácido salicílico (AS), benzotiadiazol (BTH) e ácido acetil salicílico (AAS) tamponado, tendo sido tanto a testemunha quanto a introdução resistente tratadas com água destilada. O AS foi usado na concentração de 10 mM, o BTH, na de 1,5 mM, e o AAS, na de 10 mM. A copa das plantas foi tratada com as soluções, usando-se DeVilbiss acoplado a uma bomba compressora, até o ponto de escorrimento, e as plantas foram mantidas em casa de vegetação.

As plantas foram inoculadas três dias depois, com suspensão de aproximadamente $2-5 \times 10^3$ esporos/ml, na primeira repetição do ensaio, e de 2×10^5 , na segunda repetição, por meio de DeVilbiss acoplado à bomba compressora, até o ponto de escorrimento. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara-de-nevoeiro, a 25°C, e fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas, foram transferidas para casa de vegetação.

Na primeira repetição do ensaio, observaram-se principalmente os eventos associados à fase de pré-penetração. Como fase de pré-penetração, consideraram-se os eventos compreendidos após a inoculação do esporo na superfície do folíolo, germinação com a emissão de tubos germinativos e o desenvolvimento dos tubos germinativos sobre a superfície, culminando ou não na formação de apressório.

Foram coletados fragmentos retangulares de folíolos de 1,5 x 0,5 cm, após 6, 24 e 48 horas da inoculação. Esses fragmentos foram retirados de acordo com o seguinte esquema: um fragmento por folíolo, sendo usados três

folíolos medianos por folha completa, por planta. Foram usadas duas plantas por tratamento e por intervalo de tempo. Para cada combinação tratamento-tempo, foram analisados seis fragmentos. As folhas das quais foram retirados os fragmentos situavam-se no terço inferior da copa de cada planta. As amostras foram imediatamente submetidas ao clareamento, seguindo o método de Longo *et al.* (1994), modificado: os fragmentos foram transferidos diretamente para cloral hidratado saturado (2,5 g/ml), para clareamento e diafanização. Depois de diafanizados, o cloral hidratado foi substituído por lactofenol (cristal de fenol : ácido láctico : glicerina, 1:1:1).

Para observação, os fragmentos foram montados em lâminas de microscópio, com a face adaxial voltada para cima. Sobre eles, foram depositadas gotas de uma solução aquosa de azul de algodão, na concentração testada previamente de 50 mg/50 ml de água destilada. Depois de cerca de cinco minutos, o excesso de corante em torno dos fragmentos foi succionado com pipeta de Pasteur e fez-se a sua substituição por gotas de lactofenol; após a deposição de lactofenol, os fragmentos foram cobertos com lamínulas de 5 x 2,5 cm. Os fragmentos foram observados e fotomicrografados em microscópio de luz marca Olympus, modelo Vanox, equipado com interferência diferencial Nomarski.

Na segunda repetição do ensaio, deu-se mais ênfase às fases de penetração e pós-penetração de *A solani* em tomateiros suscetíveis tratados com água destilada (testemunha), AS, AAS e BTH e em tomateiro resistente tratado com água destilada. Retiraram-se quatro fragmentos de 0,5 x 1,5 cm de uma folha completa, sendo cada folha obtida de três plantas diferentes, num total de 12 fragmentos por tratamento. Os fragmentos foram coletados 24, 48 e 72 horas depois da inoculação. Na fase de penetração, consideraram-se os locais de penetração pelo fungo na lâmina foliar e que foram reunidos em dois grupos aqui chamados de complexo epidérmico e complexo estomatal. O complexo epidérmico compreende a penetração pela superfície da epiderme (periclinal) ou entre a junção de duas ou mais células epidérmicas (anticlinal) ou por meio de tricomas. A penetração pelo complexo estomatal compreende

penetração pelo ostíolo do estômato, pela célula-guarda, pela junção anticlinal lateral da célula-guarda do estômato com a célula subsidiária ou pela junção anticlinal entre a extremidade (pólo) do estômato e a célula subsidiária. Foram ainda observadas as reações morfológicas produzidas pela planta em resposta à presença do patógeno, nas fases de penetração e de pós-penetração.

3. RESULTADOS

3.1. Resistência de duas espécies de tomateiro a *Alternaria solani*, induzida por quitosana, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado

3.1.1. Avaliação do efeito indutor de quitosana (quitina di-acetilada = poli [1,4-b-D-glucosamina])

Os resultados apresentaram variabilidade alta e não foram conclusivos (Figs. 1 a 2). Em todos os ensaios, em alguns dos tratamentos com quitosana, ocorreu maior número de lesões por folíolo do que na testemunha (Fig. 1). De modo geral, qualquer forma de tratamento das plantas com quitosana não interferiu no número de lesões formadas pela espécie resistente.

Observou-se que a fricção de folíolos com gaze embebida nas soluções de quitosana provocava danos à superfície foliar, causando lesões que aumentavam em número e extensão com o aumento da concentração da solução de quitosana. Na concentração mais alta (2 mg/ml), ocorreram a seca total e a queda das folhas, antes de se contarem as lesões (Fig. 2D).

Em geral, quando quitosana foi injetada ou aplicada com gaze, o número de lesões nas folhas imediatamente superior à folha tratada foi

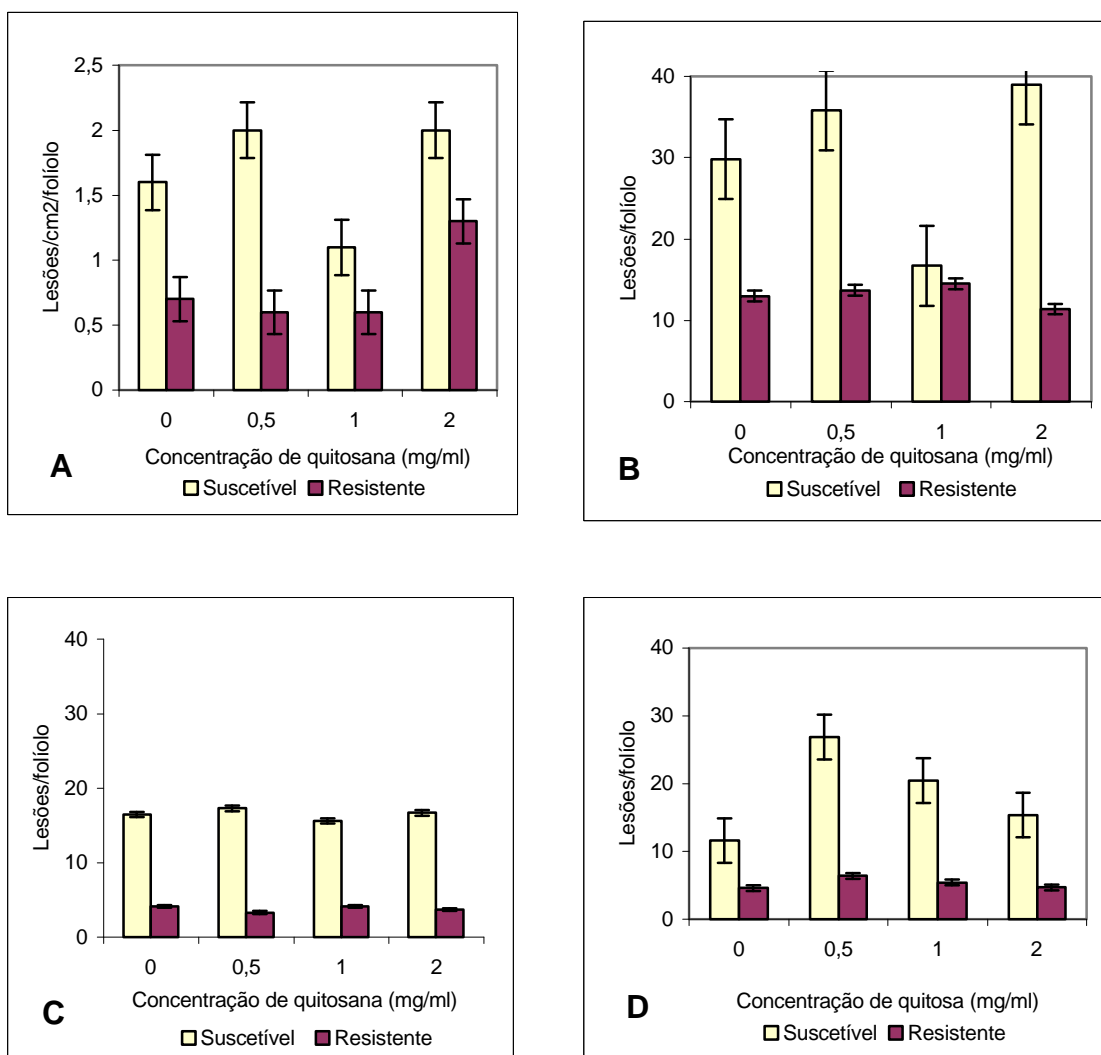


Figura 1 - Número médio de lesões por folículo de *Lycopodium esculentum* cv. Miller (suscetível) e *L. hirsutum* v. *glabratum* CNPH 417 (resistente), tratados na raiz (A), na superfície do solo (B), com injeção subepidérmica na folha (C) e com fricção com gaze (D) embebida em água destilada (0- testemunha), 0,5, 1,0 e 2,0 miligramas por mililitro de quitosana e inoculados com *Alternaria solani*. As barras sobre as colunas representam o erro-padrão da média.

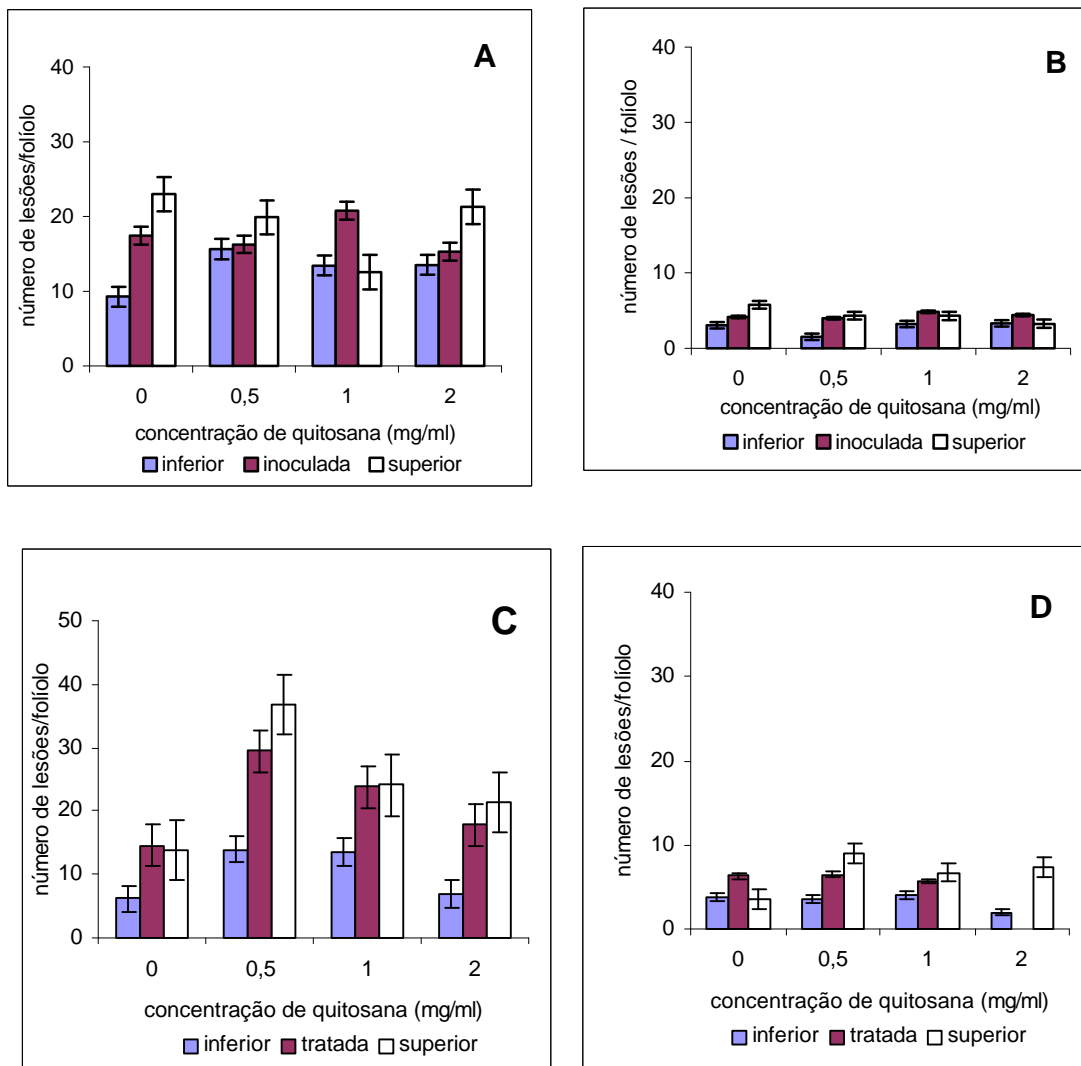


Figura 2 - Número médio de lesões por folículo de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (A e C) e de *L. hirsutum* v. *glabratum* CNPH 417 (B e D) injetados (A e B) e friccionados com gaze (C e D) com soluções aquosas de quitosana contendo 0,0 (testemunha), 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml de quitosana, e inoculados com *Alternaria solani*. Avaliou-se o número de lesões na folha tratada, na folha imediatamente abaixo à tratada e na folha imediatamente acima à tratada. As barras sobre as colunas representam o erro-padrão da média.

superior ao das demais (Fig. 2), principalmente nas folhas do tomateiro suscetível (Figs. 2A e C).

No ensaio em que as soluções foram injetadas no folíolo, aparentemente não houve diferença do número de lesões entre a testemunha e os tratamentos (Fig. 1C). Mas quando aplicadas sobre os folíolos através de gaze embebida na solução, as plantas que receberam tratamento tenderam a apresentar maior número de lesões por folíolos do que a testemunha (Fig. 1D).

3.1.2. Determinação da concentração ideal de ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico) para indução de resistência

O efeito de concentração de AS foi estatisticamente diferente para as duas espécies de *Lycopersicon* (Fig. 3).

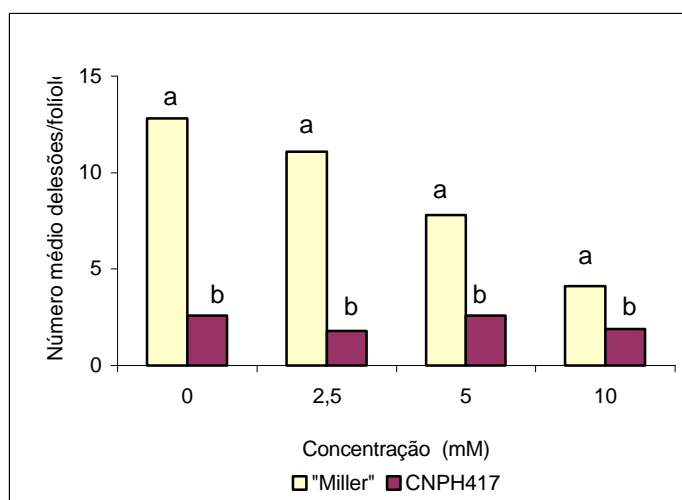


Figura 3 - Número médio de lesões por folíolos de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (susceptível) e *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH417 (resistente) após tratamento com diferentes concentrações de ácido salicílico para a indução da resistência a *Alternaria solani*. Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de F, P = 0,05), entre espécies de plantas, dentro da mesma concentração.

O tratamento com AS reduziu o número de lesões por folíolos de 'Miller' e se observou o aumento da resistência com o aumento da concentração (Fig. 3). Nesse cultivar, a relação concentração (x) – número de lesões (y) foi dada pela equação: $y = 11,77 - 0,80x$, cujo $R^2 = 0,42$. Ambos os parâmetros da equação foram significativos ($P = 0,01$) e obteve-se independência dos resíduos. Para CNPH 417, não houve efeito da concentração. Ocorreu redução do número de lesões de 13%, 40% e 68%, para os tratamentos com 2,5 mM, 5,0 mM e 10,0 mM, respectivamente. Entretanto, observou-se que AS provocava crescente fitotoxidez às plantas com o aumento da concentração. O efeito ocorria principalmente quando era aplicado através de bomba compressora e com a ocorrência de sol forte e altas temperaturas; as lesões apresentavam-se irregulares, de áreas variáveis e eram abundantes. Inicialmente, apresentavam aspecto de anasarca que evoluíam para coloração prateada e, depois de secas, tornavam-se cor de palha. As folhas do terço inferior da copa senesceram e caíram alguns dias antes das folhas das plantas tratadas apenas com água destilada.

Na segunda repetição do ensaio, também houve diferença significativa entre as concentrações quanto ao número de lesões em 'Miller', bem como não houve efeito de tratamento nem de concentrações de AS sobre CNPH417. Esta última, apesar de possuir resistência a *A. solani* na lâmina foliar, comumente apresentava lesões lineares de 2 a 5 mm de comprimento ao longo dos pecíolos e ráquis foliares e dos peciólulos.

3.1.3. Efeito de ácido salicílico (AS) e de benzotiadiazol (BTH) na indução da resistência

Houve diferença significativa entre os tratamentos com AS e os demais tratamentos, a 5% pelo teste de Tukey (Fig. 4). Também houve diferença significativa entre a espécie suscetível e a resistente (não mostrado aqui). Para 'Miller', o tratamento com AS + BTH provocou maior resistência (redução em 83% do número de lesões/folíolo), mas não foi estatisticamente diferente do efeito de AS (67%). Os efeitos de AS e BTH foram similares entre eles,

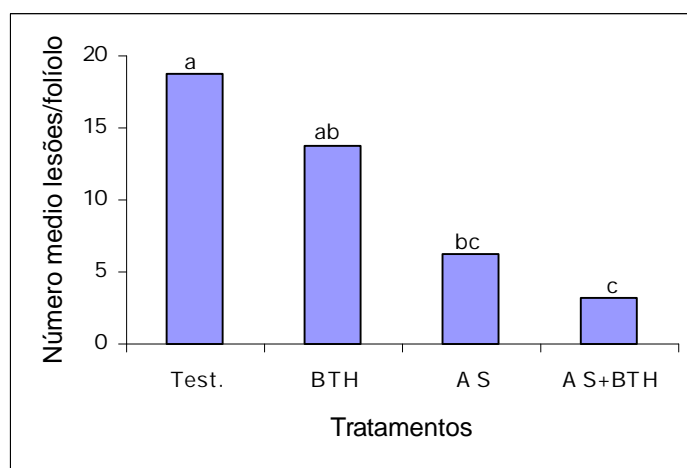


Figura 4 – Efeito de BTH, AS e AS+BTH na indução de resistência a tomateiros *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (suscetível) a *Alternaria solani*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística a 5%, pelo teste de Tukey. (Test. = testemunha).

estatisticamente, embora o de AS tenha sido superior ao da testemunha (Fig.4). Tanto AS quanto AS+BTH foram melhores que a testemunha não tratada.

Os tratamentos com BTH não levaram a quaisquer sintomas de fitotoxidez nas plantas, diferentemente dos com apenas AS. Entretanto, quando eram aplicados AS e, em seguida, o BTH, não ocorria fitotoxidez. As plantas tratadas com BTH apresentavam crescimento vigoroso e a folhagem apresentava coloração verde-escura.

3.1.4. Determinação do tempo decorrido entre a aplicação do indutor e a indução de resistência por AS e BTH

Não houve diferença significativa entre intervalos de tempo de aplicação dos indutores de resistência AS e BTH e inoculação do patógeno, pelo teste de F ($P = 0,05$) (Fig.5).

Todavia, com base nesse resultado e nas tendências observadas nos ensaios que envolviam a ação de cada indutor, separadamente, resolveu-se optar pelo intervalo de dois ou três dias entre tratamento e inoculação do fungo, nos ensaios posteriores.

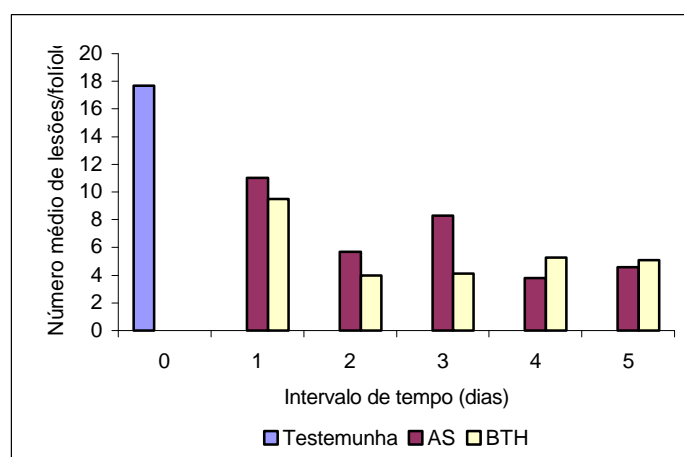


Figura 5 – Número médio de lesões por folíolo de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller inoculado com *Alternaria solani* nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias após a aplicação dos indutores de resistência ácido salicílico (AS) e benzotriazol (BTH).

Comparando os resultados obtidos entre a testemunha e as plantas tratadas com AS e inoculadas após 24 horas, a redução do número de lesões foi de 38% e, com BTH, foi de 46%. A redução do número médio de lesões formadas por folíolos das plantas foi de 68%, para as plantas tratadas com AS, e de 74%, para as tratadas com BTH, quando inoculadas entre dois até cinco dias após tratadas.

3.1.5. Efeito de ácido acetil salicílico tamponado (AAS) na indução de resistência

AAS não ocasionou resistência à pinta preta no tomateiro quando comparado à testemunha (Fig. 6). A 10mM, AAS raramente provocou lesões necróticas características de fitotoxidez nas folhagens, assim como não foi observada senescência precoce das folhas mais velhas. Entretanto, a 20 mM, AAS foi tão fitotóxico quanto AS, além de não reduzir o número de lesões. O tratamento com AS foi estatisticamente semelhante ao com BTH, e ambos foram diferentes da testemunha e do tratamento com AAS (Fig. 6). Neste ensaio, a indução com AS provocou redução de 72% no número médio de lesões; BTH de 43,2% e AAS de apenas 0,08%, em relação à testemunha.

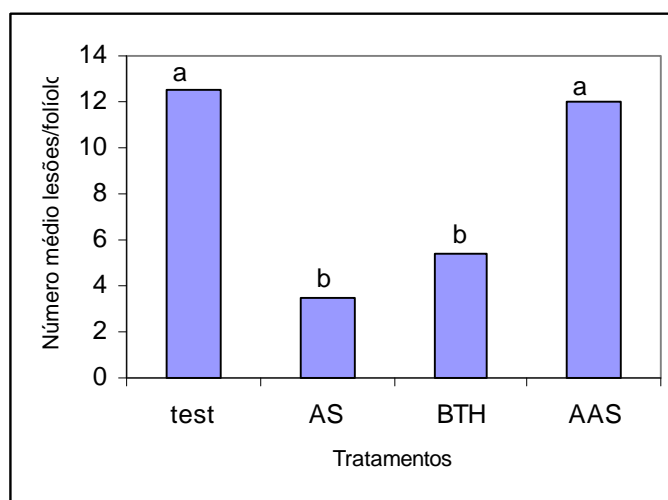


Figura 6 – Número médio de lesões por folíolo de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller inoculado com *Alternaria solani* após tratamento com água destilada (testemunha) e os indutores de resistência ácido salicílico (AS) a 10 mM, benzotiadiazol (BTH) a 1,5 mM e ácido acetil salicílico tamponado (AAS) a 10 mM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos (teste de Tukey, $P = 0,05$)

3.2. Histopatologia do efeito de indutores de resistência em tomateiros a *Alternaria solani*

Observou-se que o número total de esporos presentes, por tratamento, sobre a superfície dos fragmentos analisados aumentava com o aumento do intervalo de tempo entre a inoculação e a coleta dos materiais (Quadro 2; Fig. 7), embora as plantas tenham sido inoculadas no mesmo dia e com a mesma suspensão de esporos. Na espécie resistente (CNP417) e na espécie suscetível (cv. Miller), tratadas com AAS, AS e BTH, o número de esporos presentes foi sempre inferior ao da testemunha, em todos os intervalos de tempo.

Em todos os tratamentos, a porcentagem de esporos germinados sobre a superfície do folíolo não variou a partir das seis horas da inoculação (Quadro 1). O mesmo foi observado para o número de tubos germinativos, tanto entre tratamentos quanto entre intervalos de tempo (Quadro 1; Fig. 8). Na avaliação das seis horas, os tubos germinativos eram, em geral, curtos, variando a

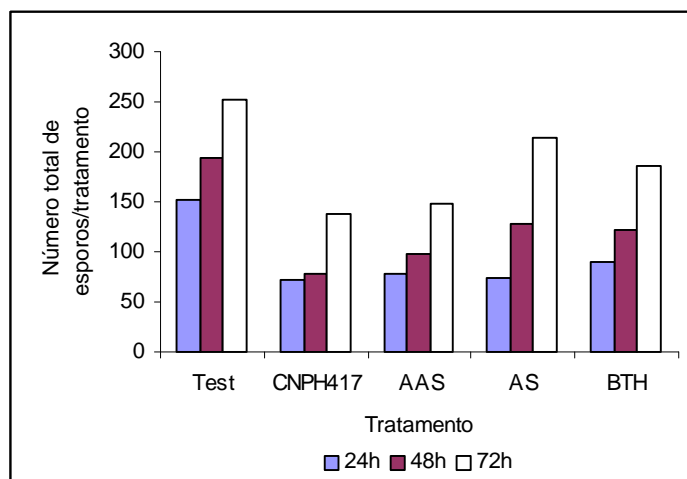


Figura 7- Número total de esporos de *Alternaria solani* presentes sobre a superfície foliar de 12 fragmentos de 0,5x1,5 cm² de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (suscetível) tratados com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e de *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), não tratado, após 24, 48 e 72 horas da inoculação.

Quadro 1 – Eventos de pré-penetração de esporos de *Alternaria solani* em folhas de tomateiro suscetível *Lycopersicon esculentum* cv. Miller, tratado com água destilada (testemunha), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e na espécie resistente *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417, não tratada com indutores, após 6, 24, 48 e 72 horas da inoculação

Tempo (h)	Tratamento	Esporo germinado (%)	Nº médio de TG/esporo germinado	Nº médio de apressório/esporo germinado	Nº médio de apressório/esporo com apressório
6	Testemunha	97,0	2,0	0,06	2,0
	CNPH 417	96,7	2,0	0,0	0,0
	AS	98,2	2,2	0,06	1,6
	BTH	98,8	2,7	0,01	1,0
24	Testemunha	97,8	2,4	0,3	1,5
	CNPH 417	99,0	2,6	0,05	1,7
	AS	98,8	2,7	0,01	1,5
	BTH	98,4	2,0	0,2	1,1
48	Testemunha	98,3	2,4	0,5	1,7
	CNPH 417	99,0	2,5	0,1	1,1
	AS	98,8	2,6	0,4	1,5
	BTH	99,8	2,9	0,3	1,4
72	Testemunha	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	CNPH 417	98,7	2,6	0,07	1,3
	AS	97,6	2,4	0,5	1,8
	BTH	97,3	2,7	0,5	1,8

N.C. = amostras não coletadas; TG = tubo germinativo; h = horas.

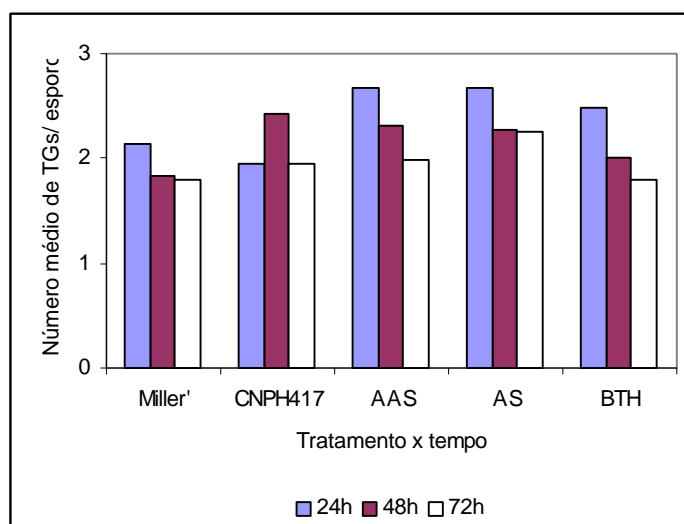


Figura 8 – Número médio de tubos germinativos (TGs) por esporo de *Alternaria solani* contados sobre a superfície foliar de 12 fragmentos de 0,5x1,5 cm² de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (suscetível), tratados com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico tamponado (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e de *L. hirsutum* v. *glabratum* CNPH 417 (resistente), não tratado, após 24, 48 e 72 horas da inoculação.

porcentagem de esporos não germinados de 2 a 4%. O número de apressórios formados por esporos foi baixo, em todos os tratamentos (Quadro 1). O número médio de apressórios por esporo germinado, dos que formavam apressórios, variou de 1,3 a 2 (Quadro 1; Fig. 9).

A partir das 24 horas, foram encontrados tubos germinativos ramificados e, depois das 48 horas, eles eram muito longos. O crescimento foi essencialmente superficial, não tendo sido verificada nenhuma modificação histológica do hospedeiro, sob microscopia de luz.

O número de apressórios por esporo germinado aumentou em cerca de 10 vezes, entre 6 e 24 horas após a inoculação, exceto na combinação AS e CNPH 417 (Quadro 1). Entre 24 e 48 horas, a taxa de aumento estabilizou, exceto para AS. O tratamento com AS retardou a formação de apressórios até aproximadamente 48 horas. Em CNPH 417, no primeiro ensaio, os apressórios se formaram a partir das 24 horas. A partir das 48 horas, o número de apressórios permaneceu estável, como na espécie suscetível.

Quadro 2 – Número total de esporos de *Alternaria solani* em 12 fragmentos de 0,5 x 1,5 cm², número médio de tubos germinativos (TG) por esporo e número médio de apressórios por esporo, na fase de pré-penetração; porcentagem de penetração do fungo pelo complexo estomatal e pelo complexo epidérmico de folíolos de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller (suscetível), tratados com água destilada (testemunha), com ácido acetil salicílico (AAS), com benzotiadiazol (BTH), e de *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), tratados com água destilada, após 24, 48 e 72 horas da inoculação

Tratamento	Pré-Penetração			Penetração	
	Nº total de esporo contado	Nº médio de TGs/esporo (E.Padrão)	Nº médio apressório/esporo (E.Padrão)	% penetração complexo estomatal (E.Padrão)	% penetração complexo epidérmico (E.Padrão)
Miller-Test.					
24 hs	152	2,1(4,54)	1,0(2,01)	45,6(0,11)	54,3(0,17)
48 hs	194	1,8(3,78)	1,2(2,83)	50,0(0,14)	50,0(0,25)
72 hs	253	1,8(4,26)	1,1(2,98)	57,0(0,16)	43,1(0,19)
CNPH417					
24 hs	72	1,9(1,88)	0,6(0,94)	0,0(0,0)	100,0(0,04)
48 hs	79	2,4(3,44)	0,3(0,70)	8,3(0,02)	91,7(0,11)
72 hs	139	1,9(3,84)	0,6(1,20)	43,7(0,05)	56,2(0,07)
Miller-AAS					
24 hs	79	2,7(4,95)	1,0(2,48)	36,8(0,06)	63,4(0,10)
48 hs	99	2,3(3,66)	1,4(2,96)	75,7(0,15)	24,3(0,07)
72 hs	149	2,0(3,17)	1,5(3,45)	44,7(0,14)	55,3(0,20)
Miller-AS					
24 hs	75	2,7(3,28)	0,5(1,0)	100,0(0,08)	0,0(0,0)
48 hs	129	2,2(3,48)	1,0(2,10)	41,1(0,14)	58,9(0,15)
72 hs	214	2,3(5,68)	1,6(5,84)	56,6(0,18)	43,3(0,22)
Miller-BTH					
24 hs	90	2,5(4,15)	0,9(2,44)	81,8(0,07)	18,1(0,03)
48 hs	123	2,0(3,48)	0,8(1,57)	44,7(0,17)	49,2(0,19)
72 hs	187	1,8(2,95)	1,0(2,98)	64,8(0,19)	35,2(0,12)

Test. = Testemunha; E.Padrão = Erro-padrão da média.

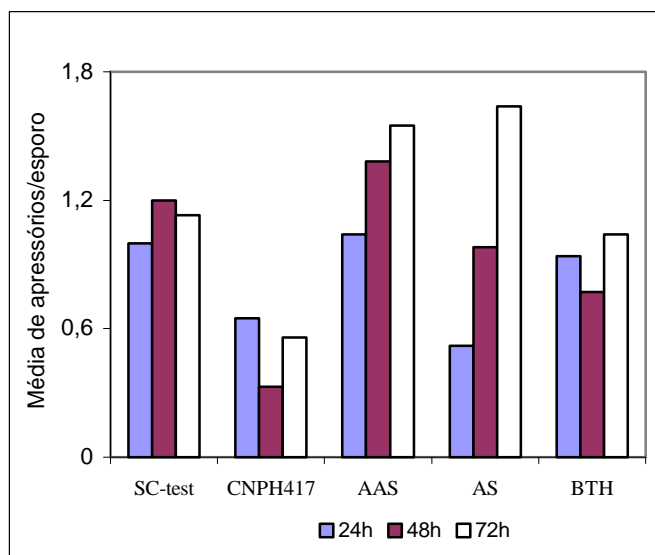


Figura 9 – Número médio de apressórios formados por esporo de *Alternaria solani* inoculado em folhas de *Lycopersicon esculentum* cv Miller (suscetível), após tratamento com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), e de *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), tratado com água destilada, após 24, 48 e 72 horas da inoculação.

Como observado na primeira repetição do ensaio, o número de esporos aderidos na lâmina foliolar aumentou com o tempo após o processamento, em todos os tratamentos (Quadro 2). Considerando o número total de esporos contados (2034) como 100%, o esporo foi mais facilmente removido quando tratado com AAS, AS, BTH e da espécie resistente, às 24 horas, ou seja, na testemunha suscetível – 7,5%, em CNPH 417 – 3,5%, na com AAS – 3,9%, na com AS – 3,7% e na com BTH – 4,4%. No entanto, às 72 horas, o número de esporos nos folíolos tratados com AS assemelhou-se ao da testemunha (testemunha – 12,4%, CNPH 417- 6,8%, AAS – 7,3%, AS – 10,5% e BTH – 9,2%). Às 48 horas, foram encontrados 9,5% dos esporos, na testemunha, 3,9% na espécie resistente, 4,8% no tratamento com AAS, 6,3% no tratamento com AS e 6,0% no tratamento com BTH. Na testemunha, em todos os intervalos de tempo, encontrou-se maior número de esporos sobre a superfície foliar que nos demais tratamentos. Considerando o número de esporos

contados às 72 horas em cada tratamento como 100%, verificou-se que, na testemunha, 60% dos conídios já estavam aderidos, às 24 horas, e 77%, às 48 horas, e, no tratamento com AAS, 53%, às 24 horas, e 66%, às 48 horas. Comparando a testemunha com a espécie resistente, verificou-se que, em CNPH 417, o número de esporos correspondia a cerca de 52% do total; às 24 horas, correspondia a 35% e, às 48 horas, a 60%.

No cultivar suscetível, verificou-se que, entre 24 e 48 horas da inoculação, os esporos já haviam germinado, penetrado (Quadro 3) e, quando esses eventos foram bem-sucedidos, haviam colonizado as células epidérmicas, tendo, em alguns locais, atingido o tecido paliçádico. Geralmente, a colonização de *A. solani* ocorria no sentido horizontal, restringindo-se às células vizinhas às células penetradas da epiderme, antes de atingir o mesófilo e, ou, a epiderme inferior. Raramente, o tecido lacunoso era também atingido. Às 72 horas, a epiderme inferior já havia sido colonizada. A colonização dos tecidos paliçádicos era principalmente intercelular. Em raras ocasiões, observou-se a colonização intracelular do tecido paliçádico. No tecido lacunoso, até às 72 horas, a colonização era apenas intercelular. Quando a lesão estava muito desenvolvida, não foi possível distinguir as células da epiderme superior porque elas tornavam-se amorfas, não individualizadas, murchas. Neste ensaio, observou-se, também, grande número de hifas superficiais em anastomose e, muito raramente, verificou-se mais de um ponto penetrado com sucesso por esporo.

Vários apressórios “germinavam” novamente, formando tubos germinativos ou hifas. Também observou-se hifa (peg) de infecção sem que ocorresse reação ou penetração da célula vegetal, isto é, a hifa de infecção não era formada no interior da epiderme, tendo sido encontrados apressórios sem hifa de infecção.

O número médio de tubos germinativos por esporo germinado foi em torno de 2,16 (Fig. 8, Quadro 2), como no primeiro ensaio, bem como o número médio de apressórios.

Quadro 3 – Número total (NT) de tipos de modificações morfológicas provocadas por *Alternaria solani* em células epidérmicas de *Lycopersicon hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417, tratado com água destilada, e de *L. esculentum* cv. Miller, tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico tamponado (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), após 24, 48 e 72 horas da inoculação

Tratamento	NT de esporo contado	NT de papila	NT de papila + halo	NT de halo	NT espessamento de parede	NT de reação de epiderme	NT de célula-guarda necrosada	NT de granulação citoplasmática	NT de acúmulo citoplasmático	Total penetrado (Total)
Miller-Test.										
24 hs	152	5	1	3	2	6	0	3	0	46
48 hs	194	56	6	8	6	13	5	8	8	88
72 hs	253	103	17	13	15	43	13	13	24	72 (206)
CNPH417										
24 hs	72	4	0	3	0	2	0	3	0	4
48 hs	79	11	0	1	1	10	0	1	0	12
72 hs	139	24	7	9	0	10	2	9	5	16 (32)
Miller-AAS										
24 hs	79	0	0	0	1	0	0	0	1	19
48 hs	99	14	4	0	2	4	6	0	5	37
72 hs	149	38	10	14	14	15	11	14	11	47 (103)
Miller-AS										
24 hs	75	4	1	1	0	0	0	1	2	12
48 hs	129	32	6	12	6	27	7	12	4	56
72 hs	214	73	19	18	29	35	19	18	8	76 (144)
Miller-BTH										
24 hs	90	7	0	4	4	4	0	4	0	11
48 hs	123	23	0	6	2	16	7	6	10	65
72 hs	187	46	12	14	14	22	12	14	5	71 (147)
Totais	2034	440	83	106	96	207	85	106	83	632

Test. = Testemunha.

O número de esporos que penetraram na superfície dos folíolos da testemunha, até à observação das 24 horas, foi, em média, 3,5 vezes superior ao das plantas tratadas e 11,5 vezes ao da espécie resistente (Quadro 3). Entre 24 e 48 horas, a percentagem de aumento de penetração foi de aproximadamente cinco a seis vezes para os tratamentos com AS e BTH, respectivamente, enquanto para a testemunha, CNPH 417 e as tratadas com AAS, a percentagem foi mais reduzida, em torno de duas vezes. O incremento da percentagem de penetração entre 24 e 48 horas foi maior que o de 48 para 72 horas (Fig. 10), quando comparados números de esporos penetrados com o número de esporos contados na superfície do folíolo, em cada tratamento e em cada intervalo de tempo.

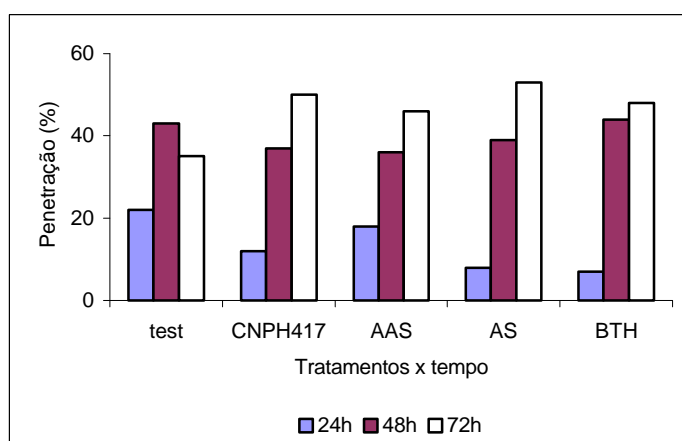


Figura 10 – Porcentagem de penetração de *Alternaria solani* em folíolos de *Lycopersicon hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente) não tratado, e de *L. esculentum* cv. Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH), após 24, 48 e 72 horas da inoculação tratados com indutores de resistência.

Nesta fase, na testemunha, a penetração se deu, inicialmente, em igual proporção pelo complexo estomatal (Fig. 11), que compreende penetração pelo ostíolo (Fig. 13D), entre a lateral da célula-guarda e a célula epidérmica subsidiária (Fig. 13B), entre paredes da extremidade ou pólo do estômato e célula subsidiária (Fig. 13F), e direto na superfície da célula-guarda (Fig. 19A), e pelo complexo epidérmico (Fig. 12), que compreende penetração diretamente da superfície exposta da epiderme (periclinal) (Fig.20A) ou entre as paredes de contato (anticlinal) entre duas ou três células da epiderme (Fig.13A). Também está incluída no complexo epidérmico a penetração através de tricoma (glandular e tectônico) (Fig.13C). A partir das 48 horas, ocorreu pequena tendência de penetração pelo complexo estomatal, embora o mais frequente fosse o anticlinal seguido de extremidade e abertura estomatal.

No hospedeiro resistente, o número inicial de esporos que penetraram foi baixo, quatro em um total de 72 esporos (Fig. 10, Quadro 3). Todos os quatro esporos penetraram pelo complexo epidérmico (Fig. 12), dois através de tricoma glandular (Fig. 11, 12 e 13C) e dois anticlinais. Apenas em duas situações, porém, o patógeno conseguiu penetrar nas células da epiderme

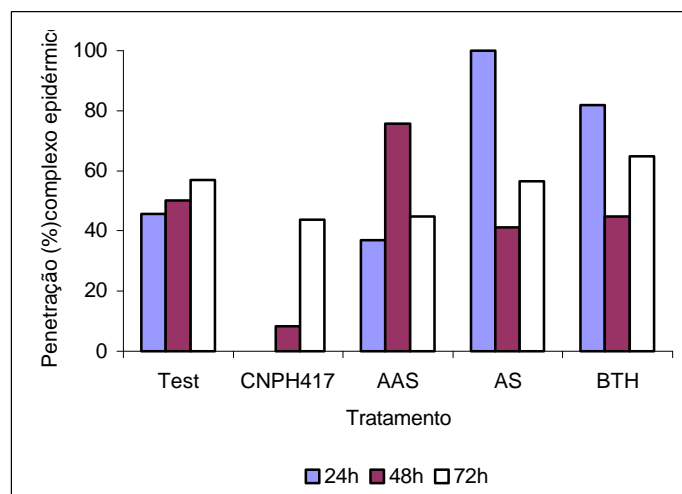


Figura 11 – Penetração de *Alternaria solani*, após 24, 48 e 72 da inoculação, através do complexo estomatal de *Lycopersicum hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), previamente tratado com água destilada, e *L. esculentum* cv. Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH).

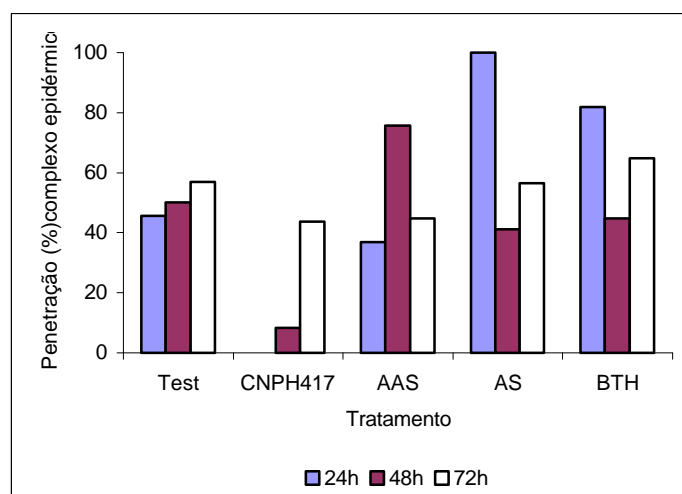


Figura 12 – Penetração de *Alternaria solani*, após 24, 48 e 72 da inoculação, através do complexo epidérmico de *Lycopersicum hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), previamente tratado com água destilada, e *L. esculentum* cv. Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido acetil salicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e benzotiadiazol (BTH).

diretamente abaixo do tricoma (Fig.13E). Na maioria das vezes, ficava restrito à glândula e, ou, às células de suporte do tricoma, não atingindo a epiderme abaixo. Entre 24 e 72 horas, começaram a ocorrer penetrações através do complexo estomatal, mas predominou a penetração pelo complexo epidérmico (Quadro 3). Até às 72 horas, a penetração se deu principalmente através dos tricomas glandulares, tanto através da glândula quanto da célula suporte.

No tratamento com AAS, em média, a penetração ocorreu tanto pelo complexo epidérmico quanto pelo complexo estomático, sendo predominantes as penetrações pelo ostíolo, pela lateral do estômato e via interepidérmica. Através de tricomas, a penetração foi baixa.

No tratamento com AS, até aproximadamente 24 horas, a penetração ocorreu exclusivamente através do complexo estomatal. Via complexo epidérmico, a penetração iniciou-se em torno de 48 horas, tendo, no complexo estomático, preponderado via ostíolo e, no epidérmico, via anticlinal. A penetração foi baixa através de tricomas (Figs. 11 e 12).

No tratamento com BTH, a via preferencial de penetração inicial foi a do complexo estomatal, tanto pelo ostíolo quanto pela extremidade (pólo) do estômato. A partir das 48 horas, em média, ocorreu igualmente entre os dois complexos, sendo as vias preferenciais a abertura estomatal, a extremidade do estômato e o meio da superfície da epiderme (periclinal).

As reações morfológicas observadas nos tecidos da planta foram papila (Figs.15 e 17A), halo, papila envolta por halo (Fig.15E,F), granulação do citoplasma (Figs.16A,C; 17B; 19A), agregação ou acúmulo de citoplasma no possível sítio de penetração (Fig.16C), espessamento (Fig 18) de cor amarronzada brilhante em pontos diferentes da parede de célula em contato com apressório ou tubo germinativo. O espessamento distingue-se da reação da epiderme (Figs.16A,C; 17B; 19A), porque os pontos de espessamento não formam um *continuum*, enquanto na reação da epiderme e na necrose de células-guarda (Figs.18A; 19C), aparentemente toda a parede torna-se espessada, conferindo coloração marrom-dourada e brilhante em toda a célula. Por serem as células da epiderme e o tecido paliçádico muito unidos, não foi

possível distinguir claramente se a lamela média também se coloria. Além dos itens acima, observaram-se, em alguns locais, a granulação (Figs.16A e C; Fig.19C) e/ou acúmulo de citoplasma (Figs. 13A e 16C).

As reações das células hospedeiras que mais se sobressaíam na presença do fungo (Quadro 3) foram papilas e reações de epiderme, apesar da ampla gama de variações entre tratamentos. A presença de papilas foi a mais constante em todos os tratamentos. Depois da formação da papila, a reação da parede da epiderme foi a mais freqüente nas plantas suscetível, resistente e no tratamento com AS (a partir das 48 horas) e com BTH. Com AAS, as reações começaram a surgir em torno das 48 horas, e, às 72 horas, o número de estruturas praticamente igualou-se ao dos demais tratamentos.

Com AS, às 24 horas, não ocorreram reações no complexo epidérmico.

Granulação e acúmulo de citoplasma, de modo geral, foram observados mais tardiamente, entre 48 e 72 horas.

Algumas vezes, a papila ou halo coloria-se de azul com o corante azul de algodão.

A partir das 48 horas, começaram a ser notadas formações de papila, espessamentos de parede e halos, geralmente em grupos de três a 10, nas células que sofreram tentativa de penetração, mas distantes dos sítios de penetração, e nas células próximas às que foram penetradas ou que sofreram tentativa de penetração ou que eram atravessadas pelos longos tubos germinativos. Esses agrupamentos, chamados aqui de “ilhas de reação” (Quadro 4), também eram vistos, com menor freqüência, à distância de cinco a 10 células epidérmicas em que houve contato com esporo ou com o tubo germinativo do fungo. Essas alterações morfológicas eram semelhantes às formadas abaixo do provável sítio de penetração e, algumas vezes, também se coloriam de azul (Fig. 18A e B). Estas “ilhas” foram raras na introdução CNPH 417.

No intervalo de 72 horas, verificou-se, em torno de sítios de penetração, um halo grande, azul (Fig. 19), que envolvia o sítio, às vezes atingindo as células vizinhas, parecendo ter-se originado de vários segmentos de

Quadro 4 – Número de “ilhas de reação” e de halo grande formados distantes do sítio de penetração de *Alternaria solani*, e de células epidérmicas com ráfides formadas sob ou próximo ao sítio de penetração, em *Lycopersicon hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417 (resistente), tratado com água destilada, e em *L. esculentum* cv Miller (suscetível), tratado com água destilada (testemunha), ácido salicílico (AS), benzotiadiazol (BTH) e ácido acetil salicílico tamponado (AAS), após 24, 48 e 72 horas da inoculação

Tratamento	Tempo (horas)	Ilha de reação	Halo grande	Ráfide
“Miller” - test.	24	0	0	7
	48	28	0	10
	72	73	14	28
CNPH 417	24	1	0	0
	48	0	0	0
	72	2	2	0
“Miller” - AAS	24	0	0	2
	48	21	0	1
	72	42	3	19
“Miller” - AS	24	0	0	1
	48	28	0	8
	72	52	9	23
“Miller” - BTH	24	0	0	0
	48	19	0	6
	72	40	6	19

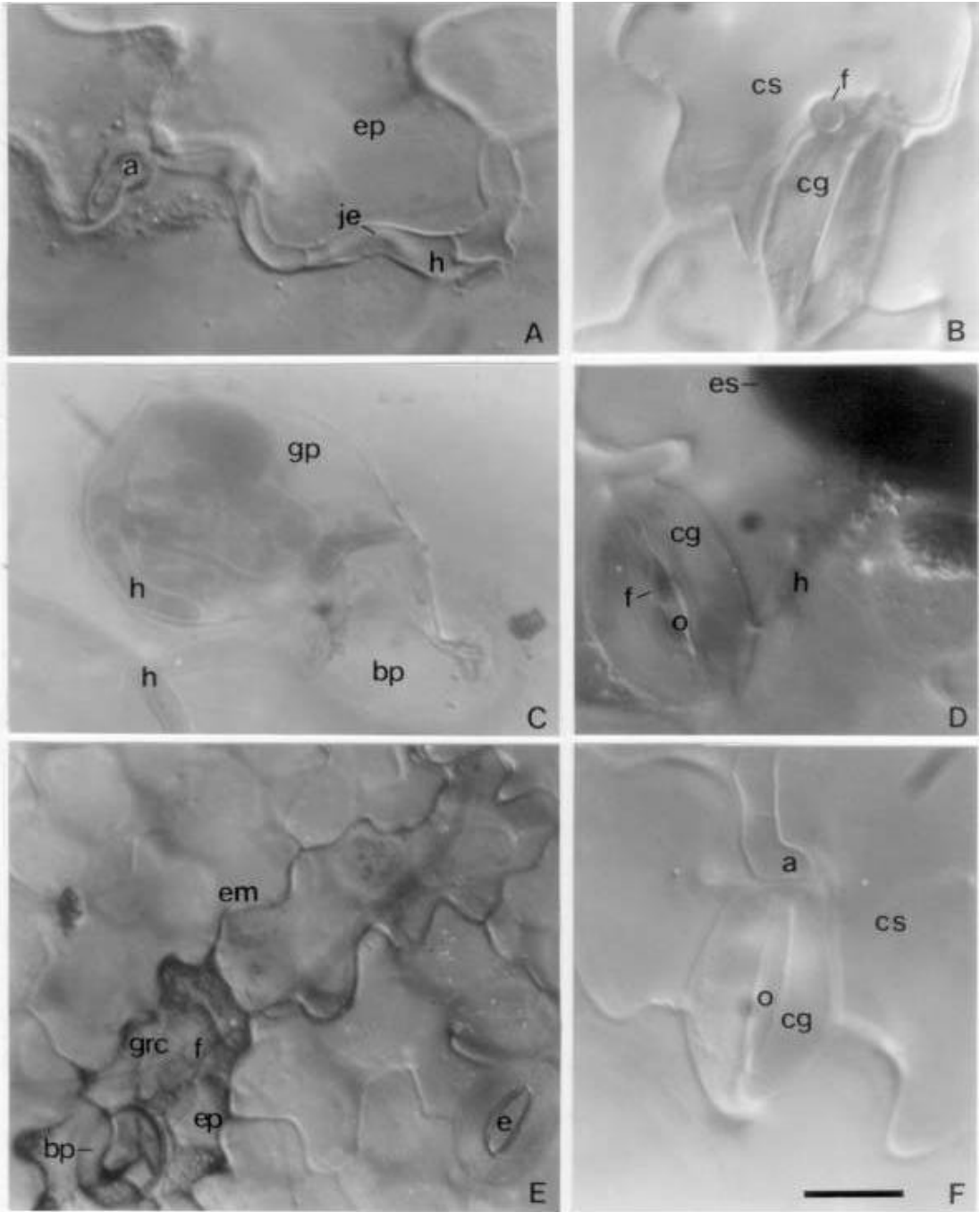
Test. = Testemunha.

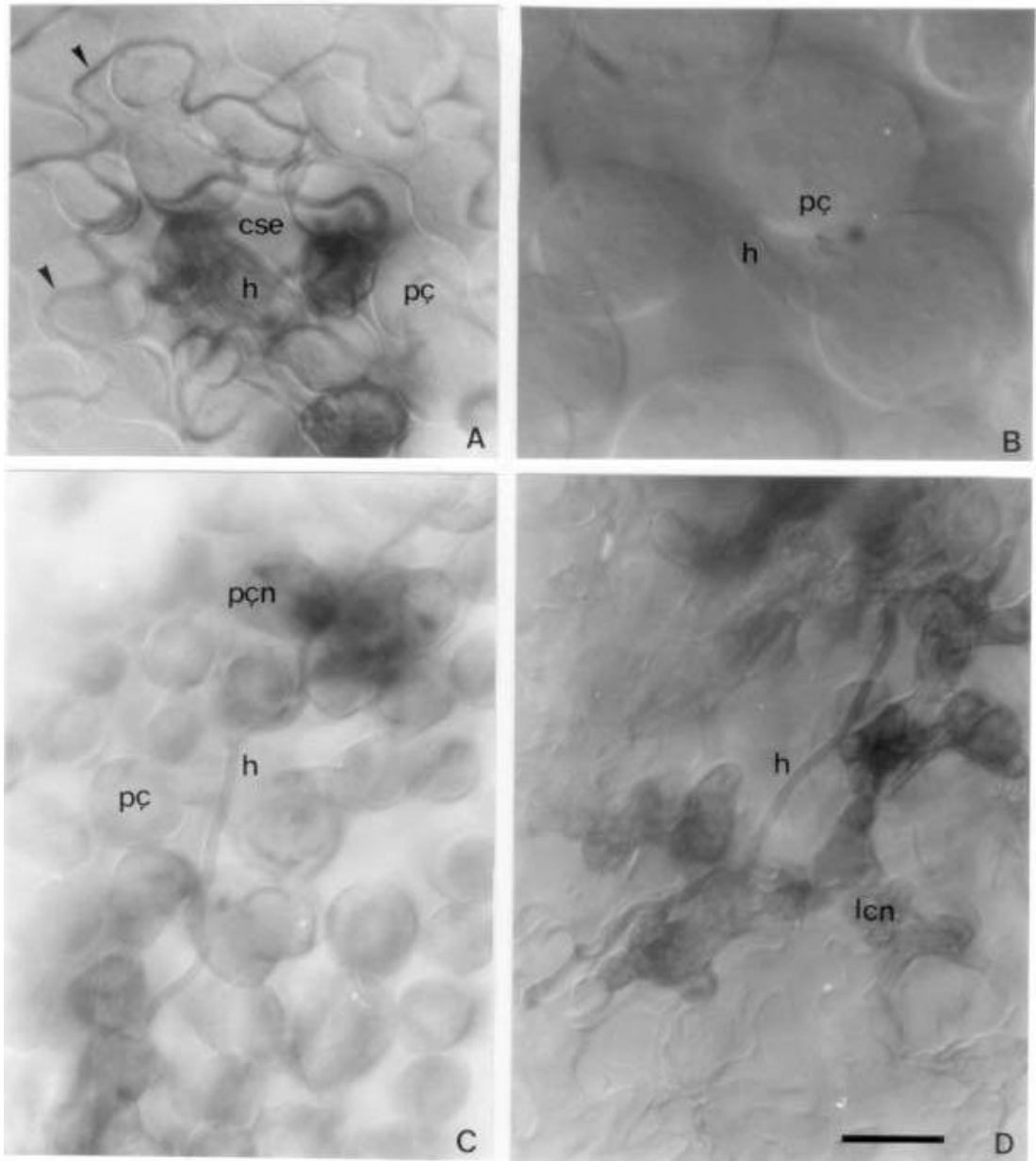
espessamento de parede que se uniam atravessando o centro das células epidérmicas ou que se restringiam às junções epiclinais das células epidérmicas vizinhas.

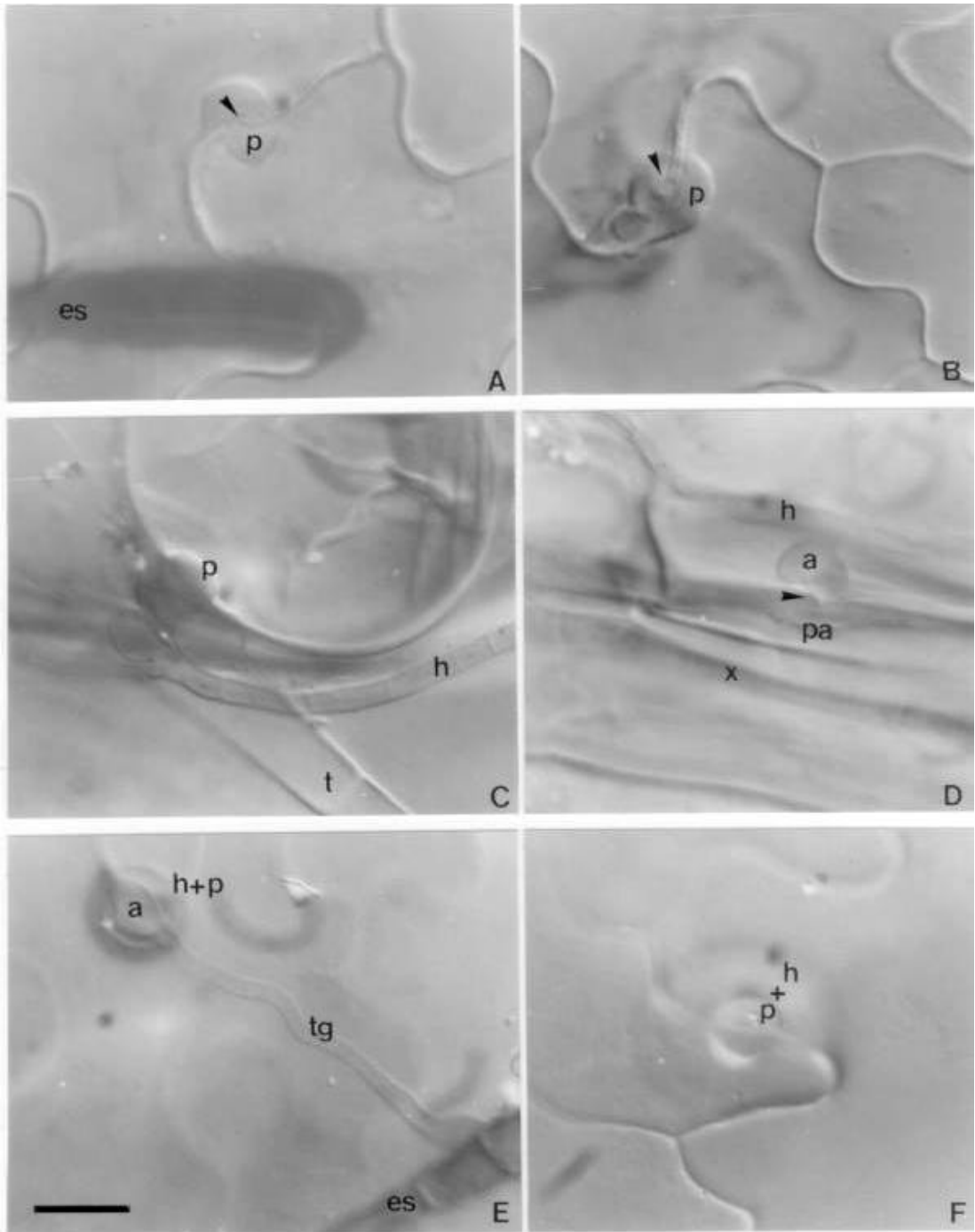
Observou-se, também, um aumento de número de células da epiderme e, ou, do tecido paliçádico com ráfides (Fig.20A, B e C) dispostas em forma de leque, acompanhando o formato da célula da epiderme (Fig.20A e B) ou do paliçádico (Fig.20C), apenas no cultivar suscetível, com ou sem tratamento. O número desses cristais era maior em torno das 72 horas. Quando os cristais de oxalato de cálcio formavam-se imediatamente abaixo do sítio de penetração, o fungo não penetrava (Fig.20B e C) e o tubo germinativo prosseguia (Fig.20A) seu desenvolvimento. Entretanto, em algumas ocasiões, quando as ráfides se formavam um pouco mais tarde ou em locais vizinhos ao sítio de penetração, o

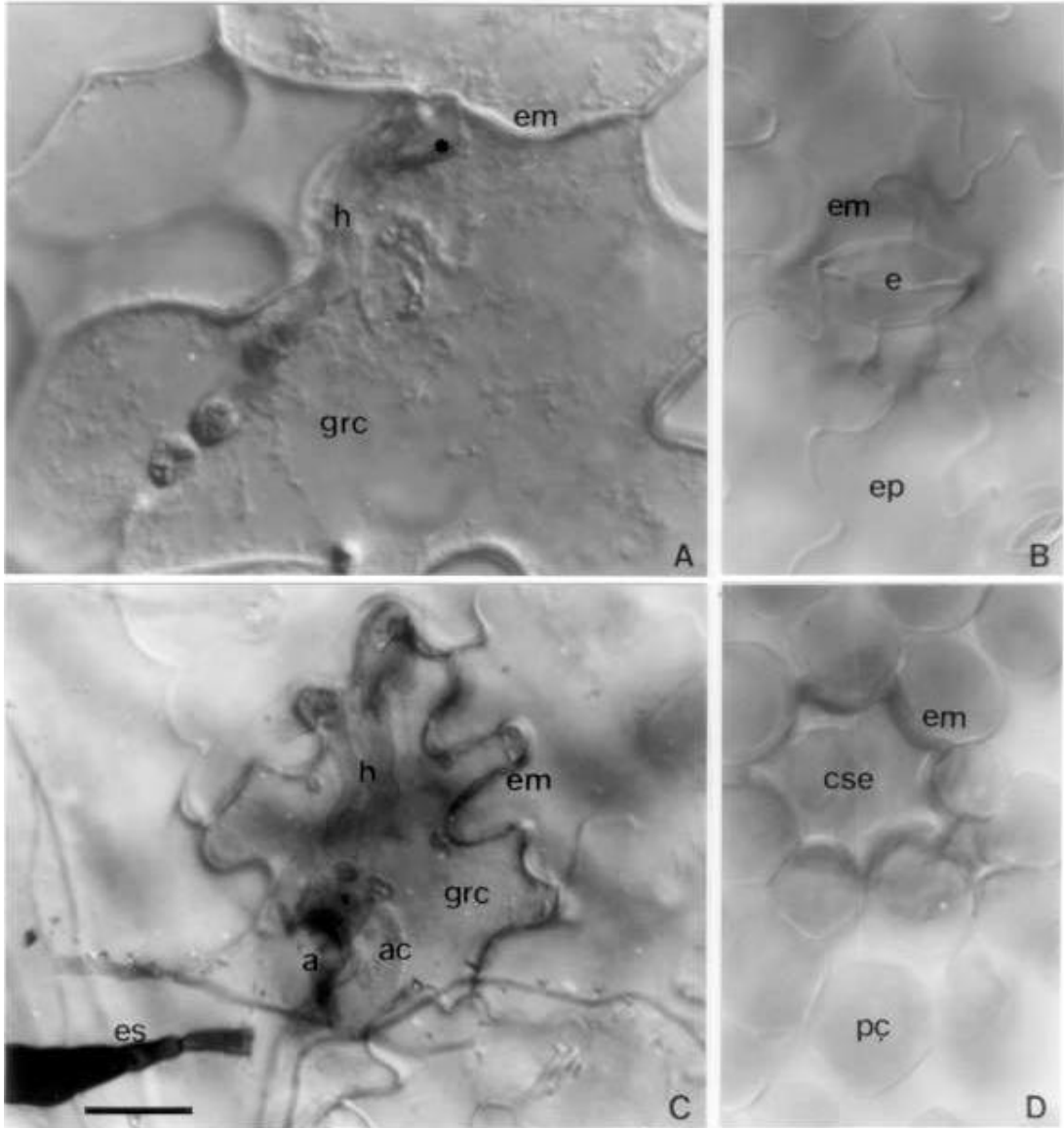
tubo germinativo penetrava, desviando-se entre as ráfides e, ou, entre a superfície superior da epiderme e as ráfides, e geralmente crescia direto em direção ao parênquima paliçádico, atravessando o parênquima lacunoso e, depois, atingindo a epiderme inferior. Na espécie resistente, *L. hirsutum* v. *glabratum*, os cristais de oxalato de cálcio ocorriam em forma de minúsculos grãos de areia que preenchiam completamente algumas células do paliçádico (Fig.20D). Não foram observadas relações entre esses cristais arenosos e infecção. Eles estavam presentes em todos os intervalos de tempo. No cultivar suscetível, poucas células continham este tipo de cristal.

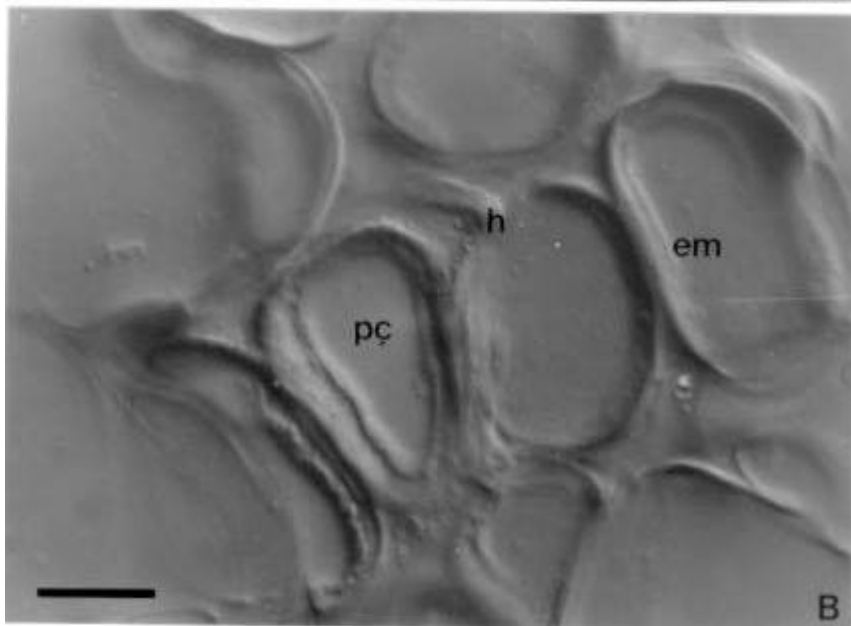
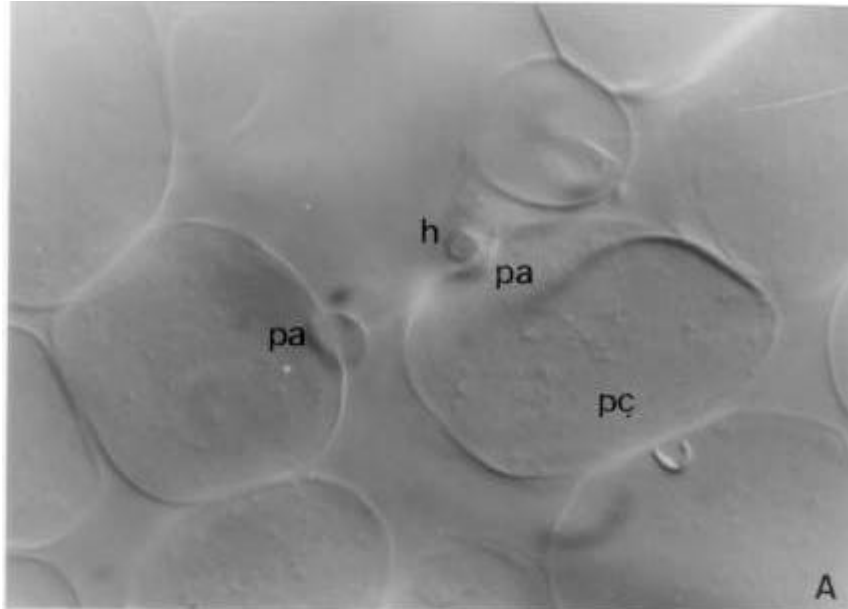
As reações de resistência observadas pareciam restringir-se às células da epiderme. Poucas vezes, foram percebidas papilas ou reações de parede em células paliçádicas (Figs. 16B, D; 17, 20C). Nestas, o que se observava, com certa freqüência, era uma coloração azul clara das células abaixo e, ou, em torno, numa área maior à da célula da epiderme colonizada, embora o paliçádico ainda não houvesse sido alcançado (Fig.14C). Esse tipo de reação ocorria geralmente adiante, em avanço à colonização, enquanto células paliçádicas com coloração azul mais intenso, em contato direto com o fungo durante o seu desenvolvimento aparentemente intercelular, pareciam ocorrer em “atraso” de três a seis pares de células do paliçádico.

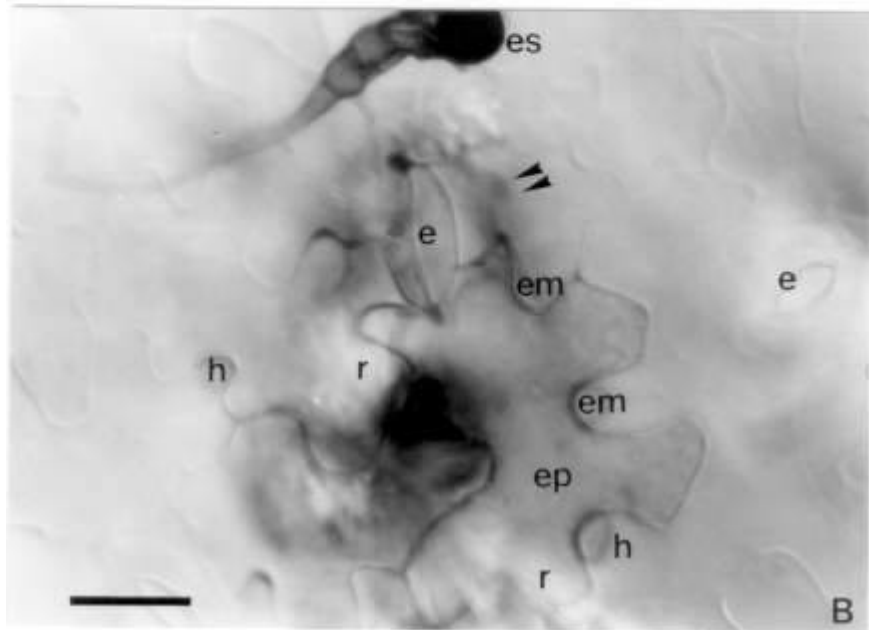
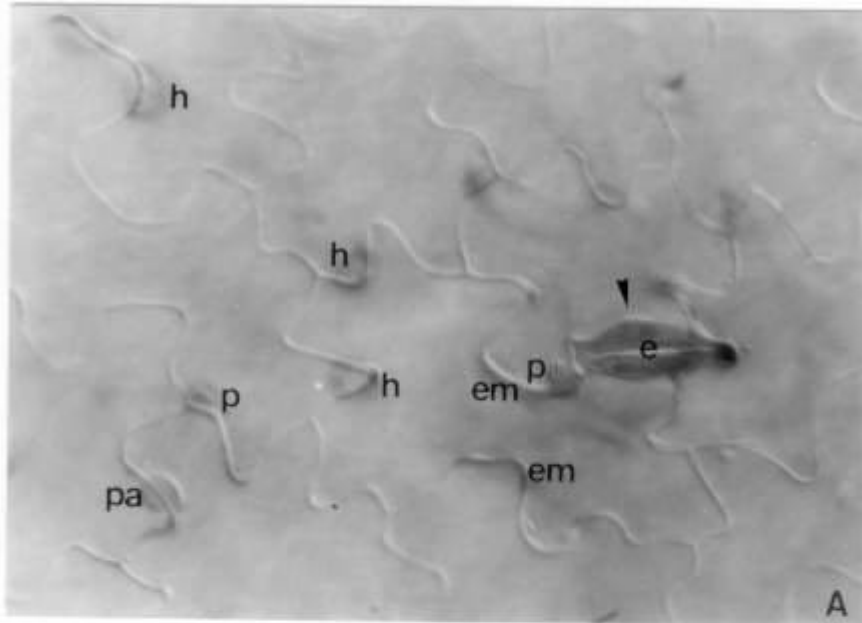


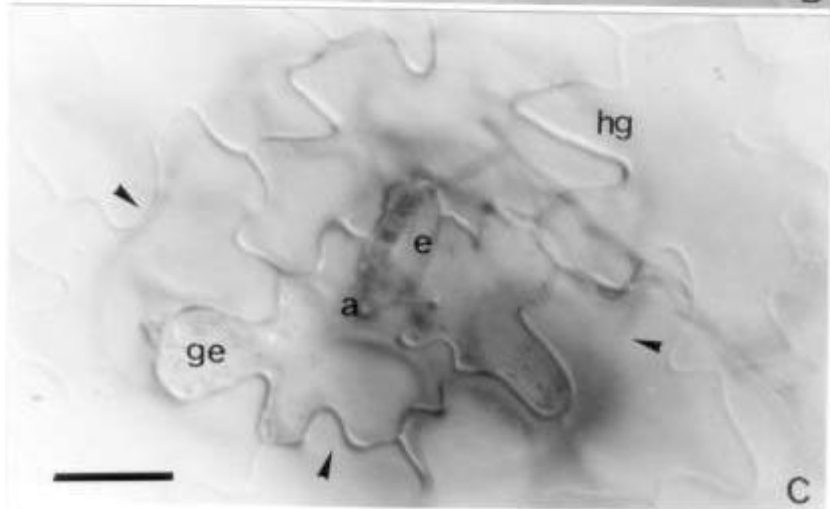
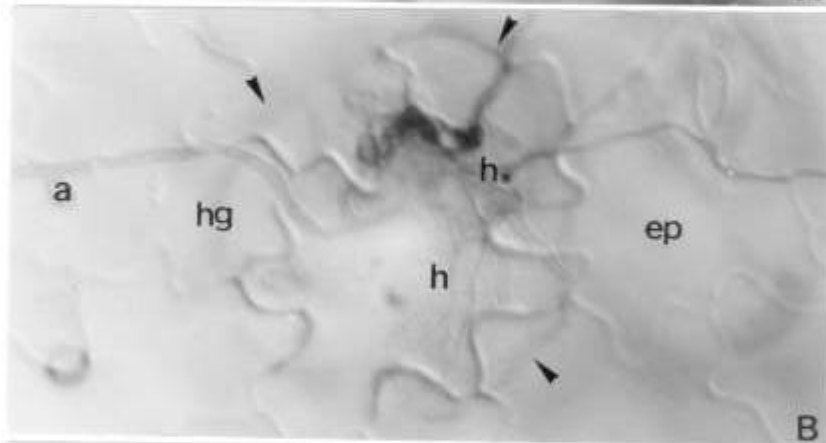
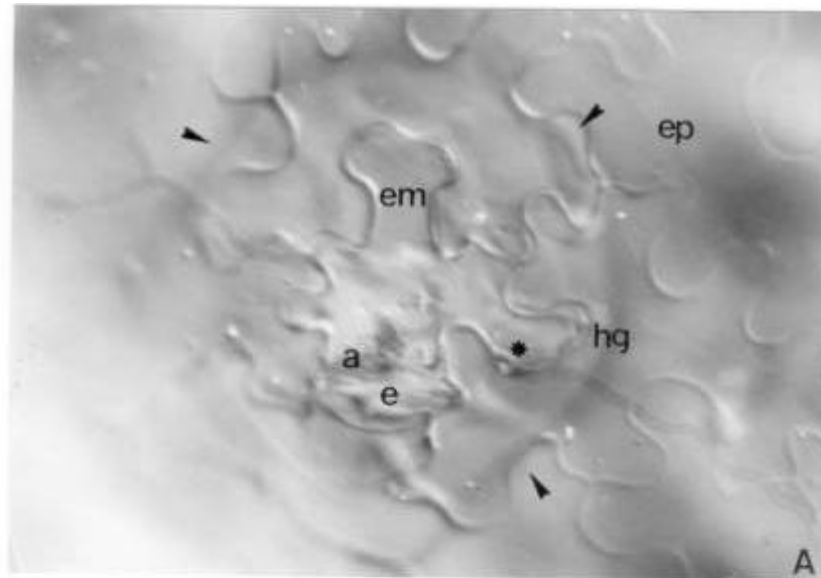


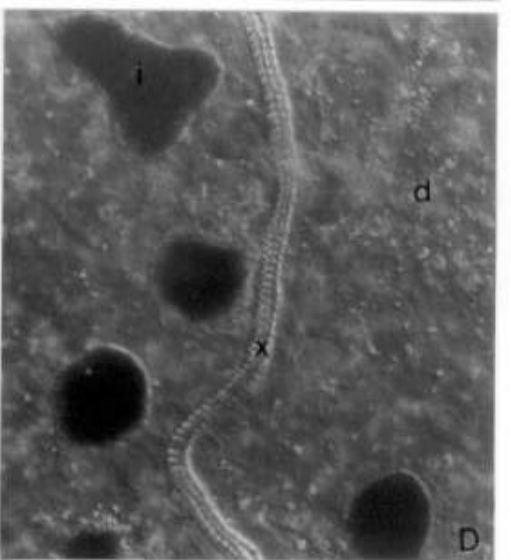
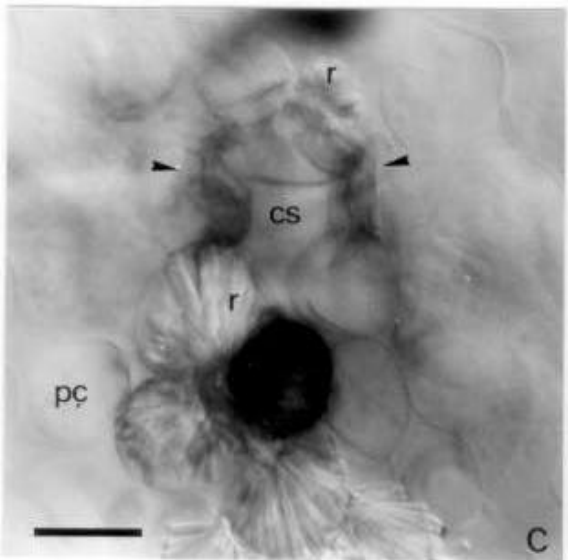
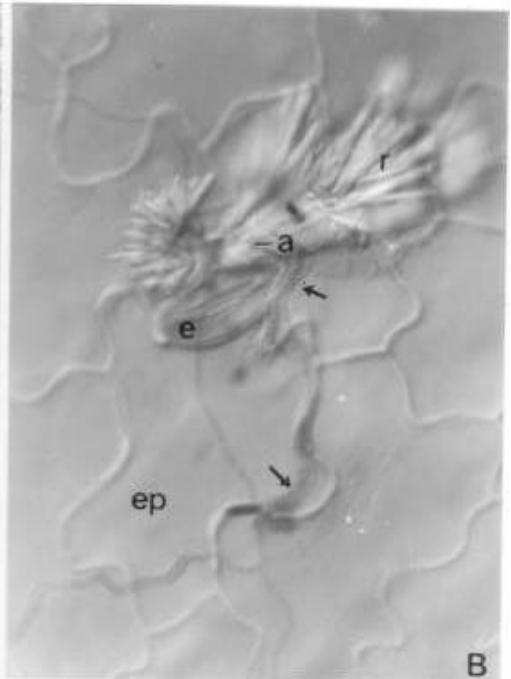
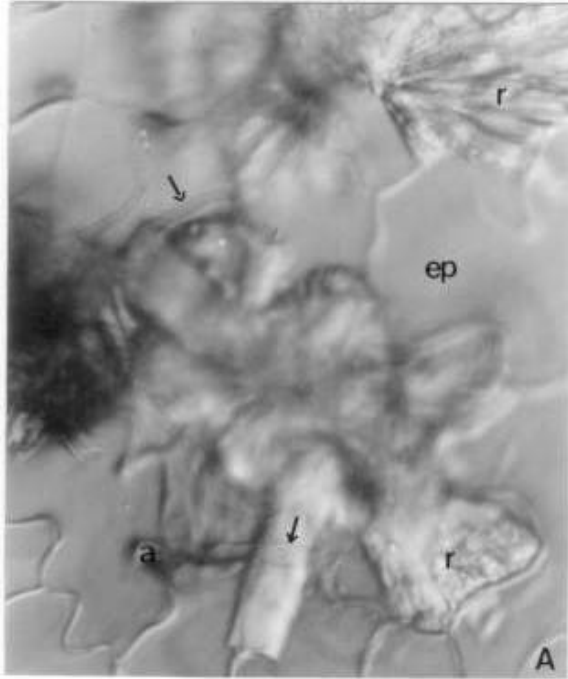












4. DISCUSSÃO

4.1. Resistência em tomateiro a *Alternaria solani*, induzida por quitosana, ácido salicílico (AS), benzotiadiazol (BTH) e ácido acetil salicílico tamponado (AAS)

A quitosana, ao contrário do que se esperava, não induziu resistência em plantas de tomateiro a *Alternaria solani*. Ela foi aplicada tanto na superfície ou infiltrada em plantas da espécie suscetível *Lycopersicon esculentum* cv. Miller e da espécie resistente *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417. Obteve-se indução de resistência de tomateiro a *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, quando a quitosana foi aplicada tanto sob forma de cobertura de raízes nuas quanto de pulverização em folhagem (Benhamou e Thériault, 1992). No presente trabalho, mesmo utilizando diferentes formas de tratamento das plantas com quitosana, não se obteve resultado similar ao anterior e, em algumas repetições, observou-se tendência em estimular a doença com o tratamento das plantas com quitosana.

Não se sabe se, neste trabalho, a quitosana estimulou o sistema específico de resistência do tomateiro a *A. solani*, o que envolve uma série de reações, muitas delas específicas como a produção de isoformas específicas de quitinases para a quitina de *A. solani* (Lawrence *et al.*, 1996). A distribuição

da quitina nas paredes celulares do fungo tem papel importante para o reconhecimento e contato entre quitina e quitinase (Benhamou *et al.*, 1990). Não se conhece a composição exata nem a distribuição da quitina nas paredes celulares de *A. solani*. Estudos posteriores de imunomicroscopia eletrônica poderão ajudar a esclarecer algumas destas dúvidas. Partindo dos resultados bem-sucedidos obtidos por Benhamou e Thériault (1992), levanta-se a hipótese de que, tendo em vista as diferenças entre formas de patogênese (*Fusarium oxysporum* X murcha vascular), a quitosana poderá não ser um bom indutor de resistência para doenças causadoras de mancha foliar (tecido parenquimatoso).

Em todos os ensaios, usando ou não indutores, a porcentagem de lesões na espécie resistente usada, *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* introdução CNPH 417, não se alterou, isto é, a aplicação de indutores não alterou a severidade de doença, em nenhuma repetição dos ensaios. Possivelmente, a composição química da superfície foliar do genótipo resistente é diferente da do genótipo suscetível, o que impediu ou dificultou a absorção dos produtos pela folha.

O ácido salicílico foi eficiente indutor de resistência no cultivar Miller a *A. solani*. Este tipo de efeito foi diretamente proporcional à dosagem de ácido salicílico (AS) aplicado como solução aquosa. O AS tem papel importante na ativação de várias respostas de defesa a patógenos, que incluem indução local e sistêmica de resistência à doença, a potenciação da morte celular do hospedeiro e outros mecanismos, tais como: lignificação, enrijecimento de paredes celulares e acúmulo de espécies de oxigênio ativo (Dempsey *et al.*, 1999).

Embora a eficiência de AS aumentasse com o aumento da concentração, decidiu-se não ultrapassar a dose máxima testada (10 mM), considerando a fitotoxidez causada na maioria das plantas. Depois de 24 horas de aplicado, era possível observar folhas jovens murchas e várias com manchas de anasarca de diferentes áreas distribuídas pela lâmina de folhas totalmente desenvolvidas. Uzunova e Popova (2000), estudando o efeito de

AS, na concentração de 100 μM , sobre folhas de cevada, verificaram que a espessura da lâmina foliar e as dimensões das epidermes superior e inferior reduziram. As folhas se enrolavam como se estivessem sob estresse hídrico. No aspecto ultra-estrutural, verificaram que os cloroplastos haviam sido afetados. A 1 mM, AS causou vasta destruição em toda a estrutura do plastídeo. Pancheva *et al.* (1996), citados por Uzunova e Popova (2000), observaram que AS reduzia a taxa de crescimento e de fotossíntese de plântulas de cevada. Em tomateiros cultivados pelo sistema de hidroponia, quando se acrescentava AS a 500 μM à solução de mineral de Murashige e Skoog, o ácido causava redução do turgor que era evidenciado pela murcha das folhas (Spletzer e Enyedi, 1999). No mesmo trabalho, os autores verificaram que a concentração de 500 μM de AS era a adequada para a indução de resistência a *A. solani* em tomateiro.

No presente trabalho, com o mesmo patógeno, a concentração necessária foi muito superior (10 mM) à usada em cultura hidropônica (500 μM) para causar praticamente a mesma redução do número de lesões (70-75%, neste trabalho, e 83% em cultivo hidropônico). Esta resposta diferencial pode ser resultante das perdas que ocorrem durante a pulverização e, ou, da lavagem da superfície das folhas dentro da câmara de nebulização. Ademais, no sistema hidropônico, a solução é absorvida direta e continuamente pelas raízes e se distribui por toda a planta via xilema, enquanto, por pulverização, a solução necessita ser absorvida através de uma camada de cera e cutícula. Portanto, a absorção do produto em cultivo hidropônico deve ser maior do que quando aplicado por pulverização foliar.

No decorrer dos ensaios, percebeu-se certa alternância de resultados quanto à eficiência de AS e BTH em induzir a resistência em relação à testemunha. Ora o AS era mais eficiente que o BTH, ora ocorria o contrário (dados não mostrados).

Várias hipóteses podem ser levantadas. As lesões de fitotoxidez causadas por AS, tanto em número quanto em extensão, embora não quantificadas ou dimensionadas, variavam com o ensaio. Em alguns deles, as

lesões coalesciam e ocorria a perda de vários folíolos ou mesmo folhas numa mesma planta ou surgiam apenas algumas lesões dispersas pelo limbo. E, de acordo com Kováts (1991), a eficiência de BTH variava com a fisiologia da planta. Entretanto, não foi possível identificar exatamente a causa da variação, mas esta poderia estar associada à temperatura no interior da casa de vegetação e, ou, à incidência de luz solar forte e constante no dia seguinte ao tratamento (os tratamentos eram realizados ao entardecer, quando o dia estava ensolarado), ou ao modo de aplicação da solução com bomba de aspersão ou manual. Conseqüentemente, o número de lesões causadas pelo patógeno podia ser mascarado em plantas tratadas com AS, embora se procurasse sempre selecionar folhas do terço inferior menos afetadas pelo ácido e repetir duas ou mais vezes o mesmo tratamento, além de sempre tratar número maior de plantas do que o número de repetições predeterminado.

Não podem ser descartados, porém, os efeitos da constituição genética da planta. Kováts (1991), trabalhando com cevada, observou o mesmo fato e considerou que o estabelecimento e o desenvolvimento das lesões variaram muito, provavelmente por condições de ambiente dentro da casa de vegetação ou pelo estado fisiológico das plantas ou virulência do fungo, e que as folhas superiores e mais jovens foram distintamente mais resistentes que as mais velhas, fato atribuído pelo autor à resistência juvenil.

Tanto o AS quanto o BTH induziram resistência em tomateiros ao fungo *A. solani*. Entretanto, o AS é fitotóxico à planta, embora não tenha sido pesquisada aqui a contribuição da fitotoxidez na capacidade indutora. O BTH foi identificado como potente indutor de resistência sistêmica adquirida em diferentes culturas (Görlach *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996). Em trigo, o BTH foi mais potente que o AS (Görlach *et al.*, 1996). Assim, neste trabalho, hipotetizou-se que o uso de BTH em conjunto com AS poderia levar a algum efeito redutor no número de lesões causadas por *A. solani* em tomateiro. Realmente, houve redução do número de lesões no cultivar Miller, embora o efeito não tenha sido sinérgico, mas aditivo (cerca de 83% de redução).

O ácido acetil salicílico (AAS) transforma-se em ácido salicílico pelo metabolismo da planta. Neste trabalho, usou-se o AAS com a finalidade de reduzir as lesões por fitotoxidez causadas por AS, mas, ao mesmo tempo, esperava-se que o AAS fosse tão eficaz quanto o AS. Entretanto, ele não teve ação indutora de resistência em concentrações iguais ou em dobro (não mostrado aqui) do usado em AS. Não foi fitotóxico ao tomateiro, quando aplicado na concentração de 10 mM; entretanto, quando aplicado na concentração de 20 mM, provocou fitotoxidez tão severa quanto a causada pelo AS.

4.2. Histopatologia do efeito de indutores de resistência em tomateiros a *Alternaria solani*

O número de esporos lavados durante o processamento das amostras diminuiu com o tempo. Este número de esporos encontrados sobre os fragmentos dos folíolos era muito reduzido, no primeiro intervalo de tempo estudado, em tomateiros tratados com indutores e em CNPH 417, quando comparados com a testemunha 'Miller', embora as plantas dos tratamentos tenham sido inoculadas com a mesma suspensão de esporos. É provável a ocorrência de alguma reação entre os produtos aplicados e a lâmina foliar nas primeiras horas, ativando algum sistema de antiaderência, como reduzindo hidrofobicidade ou composição da matriz de adesão, dificultando a adesão dos esporos e, ou, dos tubos germinativos. Os indutores não interferiram diretamente na germinação dos esporos, no número de tubos germinativos emitidos por esporo germinado, assim como no número de apressórios por esporo germinado.

A partir das 48 horas, o número de esporos e, ou, tubos germinativos aderidos foi maior; no tratamento com AS, aumentava mais rapidamente, podendo-se deduzir que o efeito de AS sobre os exsudatos da superfície foliar era menos persistente, isto é, as propriedades químicas da superfície da folha se recompunham rapidamente. Kováts *et al.* (1991) verificaram que o número de cistos de *Phytophthora infestans* germinados e aderidos às folhas de

tomateiro, depois de 14 horas da inoculação, foi consideravelmente reduzido nas plantas cujas primeiras quatro folhas mais velhas haviam sido induzidas com o próprio patógeno. Eles concluíram que um fator maior de defesa induzida de plantas de tomate a *P. infestans* atua na superfície das folhas e que essa resistência está possivelmente associada a exsudatos de tricomas glandulares e à densidade deles.

Lai *et al.* (2000), estudando o efeito de tricomas glandulares de batateira (*Solanum tuberosum*) no desenvolvimento da infecção por *P. infestans*, observaram que os dois tipos de tricomas glandulares, A e B, presentes na superfície foliar de plantas de batata, conferem resistência ao oomiceto. O efeito variava entre os dois, apresentando o tricoma tipo B efeito inibitório sobre o crescimento micelial do fungo. O tricoma tipo A contém em sua glândula substâncias com atividade polifenol oxidase e peroxidase e um substrato fenólico, e, quando a glândula se rompe e o seu conteúdo entra em contato com o ar, ocorre a produção de compostos muito tóxicos que estão envolvidos na supressão de fungos fitopatogênicos. Os autores observaram, ainda, que a densidade dos tricomas estava inversamente correlacionada ao desenvolvimento de hifa (efeito do tricoma tipo A) e à incidência de necrose (efeito do tricoma tipo B). Os autores mencionaram, também, que a composição dos exsudatos muda com o estágio fenológico da planta.

De acordo com Leite *et al.* (1999), os tricomas glandulares de tomateiro exsudam alquímicos sendo eles diferentes entre a espécie suscetível (*L. esculentum* cv. Santa Clara) e a resistente (*L. hirsutum* v. *glabratum*) e variam de acordo com a localização na arquitetura foliar. Esses alquímicos são considerados inseticidas e fungicidas e estão presentes em maiores quantidades nas espécies resistentes.

Neste trabalho, considerando que *A. solani* tem a capacidade de penetrar e colonizar tanto diretamente as glândulas quanto o suporte dos tricomas glandulares, é possível que, se a exsudação tem efeito direto sobre a aderência dos esporos e dos tubos germinativos de *A. solani*, ela somente atua depois de oxidada pelo ar, bem como que os fenóis resultantes da oxidação,

em contato com outras substâncias que poderiam ser o AS, o BTH ou o AAS ou substâncias resultantes da reação dos indutores com os exsudatos presentes no filoplano, ou os fenóis exsudados, por *L. hirsutum*, e oxidados, venham a produzir substâncias químicas inibidoras da adesão, permitindo que os esporos fossem lavados durante a preparação do material.

De acordo com Knogge (1998), para que haja confrontação real entre fungo e hospedeiro, o fungo precisa alcançar, aderir e reconhecer a superfície do hospedeiro para vir a formar estruturas de infecção e penetração. Portanto, é possível que tanto barreira física quanto química tenham influenciado a deposição e aderência do fungo, ou que tenham reduzido, já na fase de pré-penetração, o nível de infecção tanto nas plantas resistentes quanto nas suscetíveis induzidas.

Os esporos germinaram durante as primeiras seis horas após a inoculação. De acordo com French (1992), muitos voláteis químicos que estimulam a germinação de esporos de fungos estão amplamente distribuídos na natureza como componentes de aromas, sabor, cor e, ou, óleos essenciais. Entretanto, em observações preliminares, observou-se que os esporos de *A. solani* germinam igualmente quando em água destilada ou em soluções obtidas da lavagem da superfície das folhas de tomateiro resistente e suscetível com água destilada. Portanto, a presença de água livre é suficiente para estimular a sua germinação, não havendo necessidade de outros estímulos.

Assim, após o processamento, ao se observar que o número de esporos encontrados supostamente aderidos sobre a superfície foliolar de Miller era superior ao dos demais tratamentos, pode-se concluir que os produtos, de alguma forma, lavam ou reagem com substâncias presentes na superfície da folha, dificultando a aderência dos tubos germinativos e apressórios, mas sem afetar a viabilidade ou a germinação dos esporos.

Pelas observações feitas aqui e por Araújo (2000), o tubo germinativo de *A. solani* não apresenta tigmotropismo. Durante as primeiras seis horas, o esporo germina, lançando um ou mais tubos germinativos que se desenvolvem ao acaso, sem direção definida. A formação de apressórios começou a ser

observada, com maior frequência, mais tarde, em torno das 24 e 48 horas. Os apressórios formados não eram melanizados e nem sempre conseguiam penetrar na superfície do hospedeiro, às vezes nem mesmo se fixando ou lançando hifa de infecção. Foram observados apressórios laterais e terminais, assim como intercalares (Araújo, 2000). Acredita-se que os intercalares sejam formados pelo não-reconhecimento do sítio para uma penetração bem-sucedida e, assim, o apressório, que era terminal, germina e continua a se desenvolver como tubo germinativo ou hifa, de forma aleatória, às vezes passando sobre aberturas estomatais ou se enrolando em torno da base de tricomas, ou simplesmente sobre a superfície foliolar, vindo a penetrar, muitas vezes, a longas distâncias do esporo de origem.

Tendo em vista o comprimento excessivo de vários tubos, é possível que possuam a mesma capacidade de uma hifa de se nutrir de exsudatos e depósitos encontrados no filoplano. Talvez daí a tendência de se desenvolver ao longo de junções de células epidérmicas, principalmente as localizadas sobre as nervuras ou regiões vizinhas a elas, que formam depressões mais profundas, as quais podem acumular mais exsudatos e outras substâncias que aí se depositarem. Outra possível explicação pela preferência pelas junções é que as depressões permitem maior aderência da hifa.

Verificou-se a tendência de o tipo de indutor e a espécie do tomateiro interferirem sobre o local de penetração, embora o número total de penetração em cada um desses locais não tenha sido suficientemente alto para afirmá-lo categoricamente. Na testemunha suscetível, o fungo penetra igualmente tanto pelo complexo estomatal quanto epidérmico. Observou-se uma tendência diferenciada quanto a sítios de penetração entre *L. esculentum* e *L. hirsutum* v. *glabratum*. Na espécie suscetível, tratada ou não, a tendência é de penetração tanto pelo complexo epidérmico quanto estomatal. Na resistente, entretanto, prevalece a tendência de penetração pelo complexo epidérmico; dentro deste complexo, o tricoma revela maior efeito atrativo, embora o número observado seja muito baixo para se concluir.

Em todos os tratamentos, mesmo tendo *A. solani* penetrado e colonizado tricomas glandulares, o fungo geralmente não ultrapassava as células da base do tricoma e não penetrava nas células da epiderme adjacentes. Exceto em duas ocasiões observadas, num total de 49 de penetrações por tricomas, o fungo atingiu as células da camada da epiderme logo abaixo e colonizou a lâmina da folha. Entretanto, o número de eventos ocorridos foi muito baixo para se tirar alguma conclusão definitiva.

A tendência de queda de penetração na testemunha suscetível, às 72 horas, é explicada pelo número muito alto de esporos presentes na superfície foliolar que, após germinados, formavam um emaranhado de esporos e micélios e, ou, tubos germinativos, tornando impossível o acompanhamento individualizado da origem do tubo germinativo. Esses grupos de esporos foram descartados da contagem. Eles eram encontrados menos freqüentemente na espécie resistente e nas plantas tratadas, em razão do número inicialmente reduzido de esporos presentes na superfície.

Observou-se, todavia, que a proporção de esporos penetrados, até às 24 horas, era quatro vezes maior na testemunha e no tratamento com AAS do que nos demais tratamentos, quando comparados com o número de esporos contados. Isto evidencia que, embora AAS apresente algum efeito sobre a fixação dos esporos sobre a superfície, ele não os impede de germinarem, penetrarem e colonizarem como a testemunha. Por outro lado, o AS e o BTH parecem ter reduzido o efeito inibitório da penetração em torno das 48 horas, quando todos os tratamentos, exceto a espécie resistente, praticamente se igualam.

As alterações de parede e citoplasmáticas somente foram observadas em plantas inoculadas com o patógeno, tendo sido ou não tratadas com indutor. Dos eventos observados de pós-penetração ou de tentativa de penetração, a papila foi a mais encontrada, em todos intervalos de tempo e em todos os tratamentos, sendo, na testemunha suscetível, a sua freqüência igualada à reação da epiderme, ou seja, a espessamentos localizados de parede celular da planta.

A papila é considerada, por Brown *et al.* (1998), como parte integral da resposta de plantas ao desafio de patógenos. Sua formação envolve a síntese e a deposição direta de material de parede celular no sítio de interação. Apesar de conterem todas as classes de substâncias mais importantes na composição da parede primária (polissacarídeos, proteínas, fenólicos), as papilas são marcadamente diferentes da parede primária. São estruturas complexas onde foram encontrados calose e um componente da calose sintase, na interação *Xanthomonas campestris* e feijão, sendo, nesse caso, segundo Brown *et al.* (1998), a síntese da calose tão rápida que a enzima ficou embebida no polissacarídeo de forma que ambas, calose e enzima, eram detectadas como uma única unidade na papila em desenvolvimento. Segundo os autores, a peroxidase pode ter uma dupla função na célula tanto gerando quanto utilizando H₂O₂ da queima oxidativa para inter cruzar proteínas e compostos fenólicos durante a construção da papila.

Heller e Gessler (1986) consideram as papilas formadas nas plantas induzidas de tomateiro como as estruturas responsáveis pela resistência a *Phytophthora infestans*. Kováts *et al.* (1991), trabalhando com a mesma interação, entretanto, discordam dizendo que nenhuma reação da epiderme da planta, em si, pode ser relacionada com a redução da frequência de penetração, mas, sim, o quão rápido as células individuais reagem hipersensivelmente quando o fungo tenta penetrar. E hipotetizam que não se pode excluir que o crescimento do fungo também seja retardado por outros mecanismos de defesa (ex: enzimas líticas, inibidores de enzimas fúngicas ou fortalecimento sistêmico da parede celular do hospedeiro) e que os padrões observados das interações fungo x hospedeiro não são as causas, mas as conseqüências citológicas visíveis da resposta de defesa. Concluem, ainda, que os resultados por eles obtidos indicam que a pré-infecção (indução) elicitava várias reações sucessivas de defesa na superfície foliar, epiderme e mesófilo e que a indução parece fortalecer o potencial da planta a reagir mais rapidamente e, assim, mais eficientemente em resposta ao invasor.

Algumas papilas se coloriam com o corante azul de algodão, indicando possível presença de calose. A frequência de coloração não foi quantificada neste trabalho. Entretanto, a inconstância da coloração também foi observada por Kováts *et al.* (1991). Segundo Berry e McCully (1990), a calose é um dos componentes de resistência presentes em papilas de resistência formadas em células epidérmicas de tricomas de *Alnus rubra* inoculadas com *Frankia sp.*. A presença de calose foi marcada por azul de algodão ou azul de anilina que, segundo Hood e Schew (1996), é um bom contrastante entre hifas e planta-hospedeira, além de colorir e estimular a fluorescência da calose. Embora Berry e McCully (1990) tenham responsabilizado a presença de calose pela resistência observada a *Frankia*, nem sempre a calose impede o desenvolvimento da hifa. Benhamou e Bélanger (1998b) afirmam que, em tomateiro previamente induzido e depois inoculado com *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, a calose formada em abundância pode ser apenas uma resposta à colonização do fungo sob forma de oclusão de algumas células, mas nem sempre impede o desenvolvimento de hifas. A formação de calose também pode ser estimulada pela presença de AS nos tecidos vegetais (Donofrio e Delaney, 2001).

O segundo evento mais observado foi a reação da epiderme que se caracterizava pela coloração amarronzado-brilhante e, às vezes, o seu citoplasma apresentava-se granuloso. Este amarronzamento ou bronzeamento celular é um evento comum da morte celular, estudada em reações de hipersensibilidade (Heath, 1998). Geralmente este tipo de célula torna-se autofluorescente. Entretanto, a microscopia de fluorescência não foi usada neste trabalho. Tanto a autofluorescência quanto o amarronzamento geralmente são resultados do acúmulo de materiais fenólicos em células mortas (Carver *et al.*, 1995), embora teoricamente seja possível às células morrerem sem que se tornem fluorescentes ou marrons (Heath, 1998).

A presença de halos e de halos e papilas foi menos comum. É possível que primeiro o halo se forme na parede e depois se agrupe fundido-se à papila. Como normalmente o halo se coloria de azul e se esta coloração de fato

corresponder à presença de calose, há possibilidade que contenha calose em sua composição, que, mais tarde, incorporar-se-ia à papila. A granulação e o acúmulo de citoplasma observados ao microscópio de luz, neste trabalho, parecem ser eventos que ocorrem mais tarde, provavelmente como resultados da ação de enzimas líticas, sendo verificados em maior número a partir das 48 horas da inoculação, assim como a necrose de células-guarda.

Observou-se, com frequência, a partir das 48 horas, com mais intensidade em plantas tratadas com AS, mais de um sítio de tentativa de penetração pelo mesmo tubo germinativo, da mesma forma que vários apressórios se formavam e “germinavam”. Abaixo de cada um desses possíveis sítios de penetração, observava-se, com frequência, algum tipo de reação da célula vegetal. Isso leva a supor que estas alterações morfológicas da parede, tais como: espessamentos, papilas e halos, não causavam a morte do patógeno, mas serviam de barreira à sua penetração. Ratificando essa posição, Brown *et al.* (1998) argumentaram, ainda, ser tal retardamento uma tática de defesa da planta até que ela pudesse ativar o seu mecanismo de produção de fitotoxinas e proteínas líticas, estas, sim, fungicidas. Além de servir como barreiras, a deposição de papilas e as demais modificações de parede servem para a imobilização de microrganismos e têm o potencial de expô-los à uma bateria concentrada de componentes antimicrobianos, tais como fitoalexinas e enzimas envolvidas na produção de espécies de oxigênio ativo (Brown *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 1980)

Os espessamentos de paredes, assim como o citoplasma das células da epiderme que reagem à presença do fungo, não se coloriam de azul. Eles adquiriam uma coloração dourado-amarronzada provavelmente pela produção de fenóis (Hammerschmidt e Kuc, 1982). De acordo com Hächler e Hohl (1984), o amarronzamento fica restrito à parede e à lamela média, não atingindo o citoplasma. Segundo Carpin *et al.* (2001) e Roy *et al.* (1994), os espessamentos de parede são provocados pela deposição de lignina, que tem origem fenólica, e por ligação entre lignina e, ou, glicoproteínas, como forma de enrijecimento e impermeabilização da parede (Quiroga *et al.*, 2000),

dificultando, assim, a ação de enzimas hidrolíticas, como pectinases, hemicelulases e celulases produzidas por alguns fungos degradadores de paredes.

Três diferentes estruturas ou grupos de estruturas, além dos supradescritos, foram observados neste trabalho. A espécie *L. hirsutum* v. *glabratum* é rica em células repletas de oxalato de cálcio em forma de minúsculos grãos de areia. Essas células raramente foram vistas em ‘Miller’. Nesta, quando tratada ou não com indutores, mas inoculadas, eram formados cristais de oxalato de cálcio em forma de ráfides que preenchiam células inteiras ou parte de células, a partir das 48 horas, mas com maior frequência às 72 horas. As ráfides eram encontradas tanto no tecido epidérmico superior quanto no paliçádico. Elas foram encontradas, também, embora raramente, nas células-suporte de tricomas. Essas ráfides eram dispostas organizadamente, geralmente em forma de leque e, com o tempo, ocupavam toda a célula da epiderme ou do paliçádico, tomando a sua forma interna.

Essas estruturas ou grupos pareciam, de alguma forma, participar do sistema de defesa da planta. Geralmente, quando formadas antes da penetração e logo abaixo do provável sítio de penetração, elas impediam, pelo menos temporariamente, a penetração e, ou, a colonização da célula-alvo. As que eram formadas um pouco depois, a hifa de colonização se desenvolvia, entre a parede periclinal e as ráfides, contornando-as até atingir um ponto ou abertura entre elas que permitisse a sua passagem, geralmente crescendo diretamente no sentido do tecido paliçádico e o tecido lacunoso logo abaixo. Nessas ocasiões, a colonização da planta pelo fungo não era predominantemente horizontal, mas vertical, até atingir um tecido livre de ráfides.

De acordo com Horner *et al.* (2000), o oxalato de cálcio também é encontrado em plastídeos e vacúolos, podendo ser formados em resposta ao aumento de produção de AS, o que eles verificaram em plantas de *Yucca torreyi*. Na célula que não tiver o seu mecanismo de resistência ativado, ou que for ativado mais tardiamente, as ráfides já não teriam efeito “retardador” da colonização. Assim, as ráfides observadas poderiam ter função semelhante

às das modificações de paredes, isto é, servir como barreira física à colonização, pelo menos temporariamente.

Uma segunda estrutura, chamada aqui de "ilha-de-reação", foi encontrada, com frequência e em número crescente, a partir das 48 horas da inoculação. Essas "ilhas" eram constituídas por grupos ou unidades das estruturas morfológicas de resistência já mencionadas, como papilas, halos, papilas e halos, espessamento de parede e, algumas vezes, acúmulo de citoplasma em determinada região da célula. Não foram encontrados granulação de citoplasma, reação de célula da epiderme nem de halo grande ou anel, o qual será mencionado adiante. Essas "ilhas" eram formadas geralmente em áreas vizinhas ou próximas aos esporos ou a tubos germinativos, mas não em contato direto com o fungo, como se regiões ou células vizinhas ao patógeno estivessem formando barreiras a uma tentativa de penetração.

A terceira estrutura era constituída de grandes halos ou anéis que tomavam coloração azul com o corante azul de algodão, provavelmente ricos em calose. Eles foram observados apenas no intervalo de 72 horas após a inoculação. Da mesma forma que as "ilhas", pareciam uma estrutura a mais de defesa, numa tentativa de inibir o desenvolvimento do fungo além daquele limite. Poucas vezes, verificou-se, mesmo na espécie suscetível não tratada, a ultrapassagem dos limites do halo ou anel por uma lesão, embora as observações tenham sido realizadas apenas até 72 horas após a inoculação. Em seu interior, geralmente estavam compreendidas uma a três células da epiderme. A frequência desses halos não foi alta em nenhum dos tratamentos, provavelmente por serem eventos de ocorrência mais tardia. Costet *et al.* (1999) mencionam que em folhas de fumo que reagem apresentando HR à infecção por patógeno, a resistência localizada adquirida (RLA) é induzida em uma zona nítida que circunda as lesões de HR e envolve, entre outros, a expressão de proteínas PR e mudanças no nível de AS-sinal, mas não tendo AS como sinal. Isto poderia ser confirmado se se considerar que o número de lesões observado a olho nu por área foliolar é muito inferior ao observado ao

microscópio. Isto é, em fragmentos de 0,5x1,5 cm, ou seja, de 0,75 cm², foram contabilizados de 0 a 15 tentativas ou mais de penetração por fragmentos, enquanto em um folíolo inteiro encontraram-se de 0 a 60 lesões. Pode-se, portanto, deduzir que algum ou a combinação de vários sistemas de resistência foi efetivo contra as múltiplas tentativas de o fungo causar infecção.

Assim, pode-se dizer que tanto o AS quanto o BTH e o AAS contribuem na fase inicial, para o controle da pinta preta, reduzindo a aderência dos tubos germinativos na superfície foliar dos tomateiros. Além disso, o AS e o BTH também contribuíram ao retardarem a penetração de *A. solani* por cerca de 48 horas após a inoculação. Entretanto, aparentemente, as reações morfológicas citologicamente investigadas, isoladamente, eram as únicas responsáveis pela redução de penetração bem-sucedida observada inicialmente na espécie resistente e nas tratadas com indutores, tendo em vista que foram igualmente observadas na testemunha. Mas, por outro lado, considerando que 'Miller' demonstra algum grau de resistência, era de se esperar que essa resistência se manifestasse de alguma forma.

Pelos resultados obtidos na histopatologia e em informações levantadas na literatura, acredita-se que as barreiras morfológicas contribuam para a reação de resistência tanto contra a penetração, após a fase de adesão, quanto contra a colonização, embora não sejam a causa da resistência. Um conhecimento mais detalhado, obtido de testes químicos ou de diferentes tipos de microscopia, permitiriam relacionar melhor as modificações estruturais das células com a resistência.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Aplicaram-se quitosana, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado, formulados em soluções aquosas, em plantas de *Lycopersicon esculentum* cv. Miller e *L. hirsutum* v. *glabratum* introdução CNPH 417, suscetível e resistente, respectivamente, a *Alternaria solani*, agente causador da pinta preta em tomateiro. Os objetivos do trabalho foram: i- verificar a eficácia dos indutores de resistência no tomateiro à pinta preta e ii- realizar a histopatologia, com microscópio de luz, a fim de verificar as mudanças morfológicas, em nível celular, produzidas como resultado da indução de resistência e se essas mudanças estariam relacionadas com a resistência.

Nos ensaios de seleção da substância indutora, a quitosana foi usada nas concentrações de 0,0 (testemunha), 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml. As soluções foram aplicadas como imersão de raízes de mudas; como irrigação da superfície do solo envasado com uma planta, cujas raízes haviam sido feridas; injetando-se subepidermalmente, nas folhas, meio a um mililitro das diferentes concentrações; ou friccionando-se gaze embebida nas soluções sobre as lâminas de folhas. Todas as plantas usadas encontravam-se na idade fisiológica madura, entre 35 e 50 dias após a semeadura, exceto as do ensaio de imersão de raízes, em que as mudas apresentavam 18 dias de idade após a

semeadura. Após 15 dias, para o ensaio de imersão de raízes, e três dias, para os demais ensaios, as plantas foram inoculadas com suspensão de $2,5 \times 10^3$ esporos/ml de *A. solani*. Na avaliação, contou-se o número de lesões por folíolo. A quitosana não apresentou efeito indutor de resistência em nenhum dos ensaios.

Nos ensaios com ácido salicílico (AS), benzotiadiazol (BTH) e ácido salicílico tamponado (AAS), todas as plantas foram usadas quando apresentavam idade fisiológica madura, isto é, entre 38 e 50 dias de idade após a semeadura, dependendo da estação do ano. Os indutores foram aplicados nas concentrações de 10,0 mM, 1,5 mM e 10,0 mM, respectivamente, para AS, BTH e AAS. Tanto AS quanto BTH foram eficientes indutores de resistência, reduzindo a severidade da doença. Entretanto, AS apresentou forte fitotoxidez às plantas enquanto AAS não induziu resistência.

Na histopatologia, foram encontradas diferentes estruturas morfológicas formadas nas células das plantas como resposta à inoculação do fungo. Essas modificações apresentaram-se sob forma de modificações de parede (papila, papila+halo, halo, espessamento de parede) e do citoplasma (acúmulo e granulação). Essas barreiras, apenas como estruturas físicas, aparentemente não foram responsáveis pelo aumento da resistência das plantas induzidas, embora possam ter tido papel de retardadoras de penetração e de colonização, uma vez que se observou diferença entre testemunha e tratamentos com indutores.

Entretanto, estudos que utilizam sistemas diferentes de microscopia e diferentes métodos de marcação específicas a substâncias componentes de diferentes estruturas morfológicas, tais como: microscopia de fluorescência e marcação específica para fenóis, ligninas, certas toxinas, etc, serão necessários para comparar a composição química das estruturas formadas na testemunha nas plantas induzidas, com vistas em determinar o verdadeiro papel das modificações estruturais na resposta da resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKANE, Y., HOSHIKA, H., KAWASHIMA, N., FUJIYA-TSUJIMOTO, C. Comparison of chitinase isozymes from yam tuber – enzymatic factor controlling the lytic activity of chitinases. **Bioscience and Biotechnological Biochemistry**, **64**: 723-730, 2000.
- ARAÚJO, J.C.A. de. **Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiro resistente e suscetível**. Viçosa, MG: UFV. 53p. (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- BENHAMOU, N., BÉLANGER, R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **The Plant Journal**, **14**: 13-21, 1998a.
- BENHAMOU, N., BÉLANGER, R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, **118**: 1203-1212, 1998b.
- BENHAMOU, N., JOOSTEN, M.H.A.J., DE WIT, P.J.G.M. Subcellular localization of chitinase and its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. **Plant Physiology**, **92**: 1108-1120, 1990.
- BENHAMOU, N., LAFONTAINE, P.J. Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Planta**, **197**: 89-102, 1995.
- BENHAMOU, N., PICARD, K. La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. **Phytoprotection**, **80**: 137-168, 2000.

- BENHAMOU, N., THÉRIAULT, G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, **41**: 33-52, 1992.
- BERRY, A.M., McCULLY, M.E. Callose containing deposits in relation to root-hair infections of *Alnus rubra* by *Frankia*. **Canadian Journal of Botany**, **68**:798-802, 1990.
- BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, **59**:873-907, 1990.
- BROWN, I., TRETOWAN, J., KERRY, M., MANSFIELD, J., BOWELL, G.P. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. **The Plant Journal**, **15**: 333-343, 1998.
- CARPIN, S., CRÈVECOEUR, M., MEYER, M. DE, SIMON, P., GREPPIN, H., PENEL, C. Identification of a Ca²⁺-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. **The Plant Cell**, **13**: 511-520, 2001.
- CARVER, T.L.W., INGERSON-MORRIS, S.M., THOMAS, B.J., ZEYEN, R.J. Early interactions during powdery mildew infection. **Canadian Journal of Botany**, **73** (suppl.1): S632-S639, 1995.
- CASTRO, M.E.A. **Resistência do tomateiro (*Lycopersicon* spp.) à “pinta-preta” (*Alternaria solani* (Ellis e Martin) Jones e Grout)**. Viçosa, MG: UFV. 119p. (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- COSTET, L., CORDELIER, S., DOREY, S. BAILLIEUL, F., FRITIG, B., KAUFFMANN, S. Relationship between localized acquired resistance (LAR) and hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. **Mol. Plant-Microbe Interactions**, **12**: 655-662, 1999.
- DEMPSEY, D’M.A., SHAH, J., KLESSIG, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Critical reviews in Plant Sciences**, **18**: 547-575, 1999.
- DONOFRIO, N.M., DELANEY, T.P. Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **14**: 439-450, 2001.

- EL GAHOUGH, A., ARUL, J., GRENIER, J., ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, **82**: 398-402, 1992
- FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, **84**: 277-288, 1992.
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BREITER, G., HENGY, G., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, **8**: 629-643, 1996.
- HÄCHLER, H., HOHL, H.R. Temporal and spatial distribution patterns of collar and papillae wall appositions in resistant and susceptible tuber tissue of *Solanum tuberosum* infected by *Phytophthora infestans*. **Physiological Plant Pathology**, **24**: 107-118, 1984.
- HAMMERSCHMIDT, R., KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, **20**: 61-71, 1982.
- HEATH, M.C. Apoptosis, programmed cell death and hypersensitive response. **European Journal of Plant Pathology**, **104**: 117-124, 1998.
- HELLER, W.E., GESSLER, C. Induced systemic resistance in tomato plants against *Phytophthora infestans*. **J. Phytopathology**, **116**: 323-328, 1986.
- HOOD, M.E., SHEW, H. D. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. **Phytopathology**, **86**: 704-708, 1996.
- HORNER, H.T., KAUSCH, A.P., WAGNER, B.L. Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture. **International Journal of Plant Science**, **161**: 861-868, 2000.
- JONES, J.P. Early blight. In: Jones, J.B., Jones, J.P.; Stall, R.E. et al. (Eds.) **Compendium of tomato disease**. St. Paul: APS Press, 1991. p.13-14.
- KNOGGE, W. Fungal pathogenicity. **Current Opinion in Plant Biology**, **1**:324-328, 1998.
- KOVÁTS, K., BINDER, A., HOHL, H.R. Cytology of induced systemic resistance of tomato to *Phytophthora infestans*. **Planta**, **183**:491-496, 1991.
- LAI, A., CIANCIOLO, V., CHIAVARINI, S., SONNINO, A. Effects of glandular trichomes on the development of *Phytophthora infestans* infection in potato (*S. tuberosum*). **Euphytica**, **114**:165-174, 2000.

- LAWRENCE, B.B., JOOSTEN, M.H.A.J., TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, **48**: 361-377, 1996.
- LEITE, G.L.D., PICANÇO, M., AZEVEDO, A.A., GONRING, AH.R. Efeito de tricomas, aleloquímicos e nutrientes na resistência de *Lycopersicon hirsutum* à traça do tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **34**: 2059-2064, 1999.
- LONGO, N., NALDINI, B., DROVANDI, F., GONNELLI, T., TANI, G. Penetration and early colonization in basidiospore-derived infection of *Melampsora pulcherrima* (Bub.) Maire on *Mercurialis annua* L. **Caryologia**, **47**: 207-222, 1994.
- MAIEIRO, M., NG, T.J., BARKSDALE, T.H. Genetic resistance to early blight in tomato breeding lines. **HortScience**, **25**: 344-346, 1990.
- MOTTA, S. DA., SOARES, L.M.V. A method for determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products. **Brazilian Journal of Microbiology**, **31**:315-320, 2000.
- NASH, A.F., GARDNER, R.G. Tomato early blight resistance in a breeding line derived from *Lycopersicon hirsutum* PI 126445. **Plant Disease**, **72**: 206-209, 1988a.
- NASH, A.F., GARDNER, R.G. Heritability of tomato early blight resistance derived from *Lycopersicon hirsutum* P.I. 126445. **Journal of American Society of Horticultural Science**, **113**: 268, 1988b.
- O'CONNELL, R.J., BROWN, I.R., MANSFIELD, J.W., BAILEY, J.A., MAZAU, D. RUMEAU, D., ESQUERRE-TUGAYE, M.-T. Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins accumulating in melon and bean at sites of resistance to bacteria and fungi. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, **3**: 33-40, 1990.
- OOSTENDORP, M., KUNZ, W., DIETRICH, B., STAUB, T. Induced resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, **107**: 19-28, 2001.
- ROTEM, J. **The genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology, and Pathogenicity**. St. Paul, 1994. APS Press, 326 p.
- QUIROGA, M., GUERRERO, C., BOTELLA, M.A., BARCELÓ, A., AMAYA, I., MEDINA, M.I., ALONSO, F.J., FORCHETTI, S.M. DE, TIGIER, H., VALPUESTA, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, **122**: 1119-1127, 2000.

- RASKINS, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, **43**: 439-463, 1992.
- ROY, S., JAUNEAU, A., VIAN, B. Analytical detection of calcium ions and immunocytochemical visualization of homogalacturonic sequences in the ripe cherry tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, **32**: 633-640, 1994.
- SINDEN, S.L., GOTH, R.W., O'BRIEN, M.J. Effect of potato alkaloids on the growth of *Alternaria solani* and their possible role as resistance factors in potatoes. **Phytopathology**, **63**: 303-307, 1973.
- SPLETZER, M.E., ENYEDI, A.J. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. **Phytopathology**, **90**: 722-727, 1999.
- STANCHEVA, L. Inheritance of resistance to damage of the vegetative tissue caused by *Alternaria solani* in tomato. **Genetika i Seleksiya**, **24**: 232-236, 1991. CAB Abstract, Wallingford, 1993. (CD-ROM).
- STANCHEVA, L., MILANOVA, M. Genetic analysis of the character tomato leaf resistance to *Alternaria solani*. **Genetika e Seletsiya**, **25**: 314-318, 1992. CAB Abstract, Wallingford, 1993. (CD-ROM).
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, **35**: 235-270, 1997.
- TSUJIBO, H., TAKASHI, O., NAOYA, H., MIYAMOTO, K., WATANABE, T., MITSUTOMI, M., INAMORI, Y. Family 19 chitinases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: molecular cloning and characterization. **Bioscience and Biotechnological Biochemistry**, **64**: 2445-2453, 2000.
- TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, **107**: 85-93, 2001.
- UZUNOVA, A.N., POPOVA, L.P. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. **Photosynthetica**, **38**: 234-250, 2000.
- WARD, E.W.B., LAZAROVITS, G., STÖSSEL, P., BARRIE, S.D., UNWIN, C.H. Glyceollin production associated with control of *Phytophthora rot Phytophthora megasperma sojae* of soybeans by systemic fungicide, metalaxyl. **Phytopathology**, **70**: 738-740, 1980.

- WEYMANN, K., HUNT, M., UKNES, S., NEUENSCHWENDER, U., LAWTON, K., STEINER, H.-Y., RYALS, J. Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. **The Plant Cell**, **7**: 2013-2022, 1995.
- WHITE, R.F. Short communications: acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, **99**: 410-412, 1979.
- ZAMBOLIM, L., CRUZ FILHO, J. DA, VALE, F.X.R. DO. **Emprego da calda Viçosa na cultura do tomateiro (*L. esculentum*) para o controle das doenças de partes aéreas**. Viçosa, MG: UFV, 1990. 12p.
- ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M., VALE, F.X.R. do. Fungicidas da primeira geração. In: **Controle de Doenças de Plantas**. Brasília, DF: ABEAS, 1993. 26p. (Curso de Proteção de Plantas, 2).