

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**RESPOSTA ENZIMÁTICA, FISIOLÓGICA E PRODUTIVA DO  
TOMATEIRO E DESEMPENHO DE PORTA ENXERTOS  
RESISTENTES À MURCHA BACTERIANA**

**EWERTON GASPARETTO DA SILVA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Câmpus de  
Botucatu, para a obtenção do título de  
Doutor em Agronomia - Horticultura.

BOTUCATU – SP  
Setembro 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**RESPOSTA ENZIMÁTICA, FISIOLÓGICA E PRODUTIVA DO  
TOMATEIRO E DESEMPENHO DE PORTA ENXERTOS  
RESISTENTES À MURCHA BACTERIANA**

**EWERTON GASPARETTO DA SILVA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Romy Goto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Câmpus de  
Botucatu, para a obtenção do título de  
Doutor em Agronomia - Horticultura.

BOTUCATU – SP  
Setembro 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S586r Silva, Ewerton Gasparetto da, 1985-  
Resposta enzimática, fisiológica e produtiva do tomateiro e desempenho de porta enxertos resistentes à murcha bacteriana / Ewerton Gasparetto da Silva. - Botucatu : [s.n.], 2015  
xi, 85 f. : fots. color.; grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2015

Orientador: Romy Goto

Inclui bibliografia

1. Tomate - Enxertia. 2. Tomate - Doenças e pragas. 3. Estufa (Plantas). 4. Plantas - Resistência. I. Goto, Romy.  
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas.  
III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

FACULDADE DE CIENCIAS AGRONOMICAS DE BOTUCATU

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: RESPOSTA ENZIMÁTICA, FISIOLÓGICA E PRODUTIVA DO TOMATEIRO E DESEMPENHO DE PORTA ENXERTOS RESISTENTES À MURCHA BACTERIANA**

**AUTOR: EWERTON GASPARETTO DA SILVA**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. RUMY GOTO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. RUMY GOTO

Depto de Horticultura / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

Depto de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. ROMULO FUJITO KOBORI

Sakata Seed Sudamerica Ltda - Bragança Paulista/SP

Prof. Dr. ROBERTO BOTELHO FERRAZ BRANCO

Apta Regional - Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. IGÓR OTÁVIO MINATEL

Depto de Patologia - Faculdade de Medicina de BotucatuP

Data da realização: 10 de setembro de 2015.

**DEDICO**

Ao meu pai Ruenil Antunes da Silva (*In memoriam*)

À minha mãe Marinalva Fátima Gasparetto da Silva

Pelo amor, dedicação, compreensão, carinho, por ser um exemplo de vida para mim.

Aos meus familiares e amigos

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

DEUS, por iluminar meu caminho durante esta caminhada;

À Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”;

Ao Departamento de Horticultura pela oportunidade da realização do Doutorado;

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, que me ajudou durante o período do doutorado;

À Prof<sup>a</sup> Dra. Romy Goto, pela orientação, amizade, brincadeiras, ensinamentos na vida pessoal, por compartilhar seus conhecimentos de âmbito profissional, pela paciência ao longo desses anos (mestrado e doutorado), muito obrigado;

À Prof<sup>a</sup> Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima, por compartilhar seus conhecimentos de âmbito profissional e ensinamentos de vida, pelo espaço do laboratório para a realização do experimento, das brincadeiras com a senhora (muitas risadas), por dispor do seu tempo comigo, muito obrigado;

À Marina de Toledo, pelo apoio, companheirismo, incentivo e pela ajuda nos momentos mais difíceis;

À empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda., pela concessão das sementes (tomate) do porta-enxerto utilizado nos experimentos e a toda a infraestrutura fornecida para a realização das enxertias e na realização do trabalho, e em especial ao Sebastião Azevedo por todo apoio prestado;

Às empresas Takii do Brasil Ltda., Nunhems, Syngenta do Brasil, por disponibilizar sementes de tomate dos porta-enxertos e dos enxertos utilizados no trabalho;

Ao Marcelo Abumussi, proprietário da Fazenda Ituaú que cedeu a área para realização desta pesquisa e a todos os funcionários envolvidos na execução;

A todos os professores que contribuíram para minha formação e evolução como profissional;

A todos os funcionários do Departamento de Horticultura, Fazenda Experimental Pesquisa e Produção (FEPP) da UNESP em São Manuel – SP, aos funcionários do setor de transporte pelo apoio, amizade e serviços prestados ao longo do doutorado;

Aos amigos e companheiros da república, William Takata, Manoel Xavier, Jader Nantes, Diógenes Bardivieso, Tiago Catuchi, Alexandrius de Moraes, Fábio

Tanamati, Murilo de Souza, Fernando Guidorizzi, José Carlos Bvry, Thiago Nogueira, Charles Watanabe, Bruno Aires e a nossa secretária do lar, Cristiane Gomes.

Aos amigos e irmãos de orientação (“Filhos da Rummy”), Edvar Sousa da Silva, Adelana Santos, Thaís Botamede, Luís Felipe Baldini, Miguel Sandri, e da graduação, Leonardo Tatsuo, Victor Montanaro, Daniel Mariano, pela amizade e auxílio nos trabalhos;

A todos os coorientados, agregados, estagiários da Professora Rummy Goto e colegas de pós-graduação em Agronomia-Horticultura que, de forma direta ou indireta contribuíram nos trabalhos e, principalmente, com minha formação através de momentos inesquecíveis que sempre farão parte de minha vida;

À Ana Cláudia Macedo, pelo auxílio nas avaliações de trocas gasosas e enzimas;

Aos amigos William Takata, Luan Ormond e Mônica Bartira, pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao funcionário José Marcelo Soman, do laboratório de Bacteriologia – Departamento de Proteção Vegetal – UNESP Botucatu, pelo auxílio no trabalho;

Aos colegas do laboratório de Bioquímica, da professora “Fina” – IB., pelo acolhimento, auxílio, amizade e momentos agradáveis de descontração no laboratório.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

**Muito obrigado!!!**

## SUMÁRIO

|  | Página    |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>  | <b>IX</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>  | <b>X</b>  |
| <b>1 RESUMO .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2 SUMMARY .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>3 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>4 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>4.1 Cultura do tomateiro .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>4.2 Ambiente protegido .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>4.3 Murcha Bacteriana .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>4.4 Trocas gasosas .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>4.5 Enxertia em hortaliças.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>4.6 Enzimas envolvidas no mecanismo de defesa das plantas.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>5.1 Experimento I: Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) , catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) em plantas de tomateiro enxertados inoculados e não inoculados com <i>R. solanacearum</i> .....</b> | <b>21</b> |
| <b>5.1.1 Localização do experimento.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>5.1.2 Delineamento experimental e tratamentos .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>5.1.3 Relação de cultivares de enxertos e porta-enxertos de tomateiro .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>5.1.4 Produção das mudas .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>5.1.5 Preparo do solo e transplante .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>5.1.6 Preparo e inoculação da <i>R. Solanacearum</i> .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>5.1.7 Coletas das plantas para análises bioquímicas.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>5.1.8 Determinação das atividades enzimáticas.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>5.1.9 Análise estatística .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>5.2 EXPERIMENTO II: Avaliação da incidência da murcha bacteriana e trocas gasosas no tomateiro inoculado com <i>Ralstonia solanacearum</i> .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>5.2.1 Localização do experimento .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>5.2.2 Delineamento experimental e tratamentos .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>5.2.3 Relação de cultivares de enxerto e porta-enxerto de tomateiro.....</b>  | <b>30</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2.4 Preparo do solo, produção das mudas e transplante .....  | 31        |
| 5.2.5 Preparo e inoculação da <i>R. Solanacearum</i> .....   | 31        |
| 5.2.6 Avaliação da incidência da murcha bacteriana.....  | 31        |
| 5.2.6 Trocas Gasosas .....   | 33        |
| 5.2.8 Análise estatística .....  | 33        |
| <b>5.3 EXPERIMENTO III: Avaliação da incidência da murcha bacteriana e produção do tomateiro em diferentes porta-enxertos, em solo contaminado naturalmente com <i>R solanacearum</i> em ambiente protegido no município de Salto - SP.....</b>                                    | <b>34</b> |
| 5.3.1 Localização do experimento .....   | 34        |
| 5.3.2 Análise e preparo do solo.....   | 35        |
| 5.3.3 Delineamento experimental e tratamentos .....  | 36        |
| 5.3.4 Relação de cultivares de enxerto e porta-enxerto de tomateiro.....   | 36        |
| 5.3.5 Produção das mudas .....   | 36        |
| 5.3.6 Condução do experimento.....   | 37        |
| 5.3.7 Avaliação da produção e classificação dos frutos .....   | 38        |
| 5.3.8 Avaliação da incidência da murcha bacteriana (% de folhas murchas).....  | 38        |
| 5.3.9 Análise estatística .....  | 40        |
| <b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>6.1 Experimento I: Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) em plantas de tomateiro inoculadas com <i>R. solanacearum</i> e plantas sem inoculação .....</b> | <b>41</b> |
| 6.1.1 Atividade enzimática da SOD e CAT nas folhas do tomateiro .....  | 41        |
| 6.1.2 Atividade enzimática da POD, PPO e PAL nas folhas do tomateiro .....   | 44        |
| 6.1.3 Atividade enzimática da SOD no caule do tomateiro (região da enxertia).....  | 47        |
| 6.1.4 Atividade enzimática da POD, PPO e PAL no caule do tomateiro (local da enxertia) .....   | 48        |
| 6.1.5 Atividade da SOD no caule do tomateiro (Abaixo e acima do ponto de enxertia) .....   | 52        |
| 6.1.5 Atividade da POD, PPO e PAL no caule do tomateiro (Abaixo e acima do ponto de enxertia).....   | 53        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>6.2 EXPERIMENTO II: Avaliação da incidência da murcha bacteriana do tomateiro e trocas gasosas em plantas enxertadas e pé-franco de tomateiro, inoculadas com <i>R. solanacearum</i> .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>6.2.1 Incidência da murcha bacteriana .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>6.2.2 Trocas gasosas .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>6.3 Experimento III – Avaliação da incidência de folhas murcha de tomateiro (%) e produção do tomateiro em diferentes porta-enxertos em solo contaminado naturalmente com <i>Ralstonia solanacearum</i> em ambiente protegido no município de Salto – SP... ..</b> | <b>63</b> |
| <b>6.3.1 Incidência da murcha bacteriana .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>6.3.2 Produtividade .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>6.3.3 Classificação dos frutos.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>8 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>73</b> |
| <b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>74</b> |

## LISTA DE TABELAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Tabela 1.</b> Descrição de híbridos porta-enxerto „Muralha“ e do enxerto „Pizzadoro“ utilizados no experimento. UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013.....  | 23            |
| <b>Tabela 2.</b> Descrição de híbridos porta-enxerto „Muralha“ e „Woodstock“ e enxerto „Pizzadoro“ utilizados no experimento. UNESP-FCA, Botuactu-SP 2013. ....   | 31            |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados da análise química do solo. Botucatu, UNESP, 2013. ....   | 35            |
| <b>Tabela 4.</b> Descrição de híbridos porta-enxertos „Muralha“, „Guardião“ e „Woodstock“ e enxerto „Forty“ utilizados no experimento. Fazenda Ituaú, Salto - SP, 2014.....   | 36            |
| <b>Tabela 5.</b> Incidência de folhas murcha de tomateiro (%) pé-franco e enxertado inoculado com <i>Ralstonia solanacearum</i> em casa de vegetação. UNESP-FCA, Botucatu- 2013. ....   | 56            |
| <b>Tabela 6.</b> Valores da taxa de assimilação de CO <sub>2</sub> (A), Condutância estomática (gs), Concentração interna de CO <sub>2</sub> (Ci), Taxa de transpiração (E), Eficiência do uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação (Ec) em plantas pé-franco e enxertadas de tomateiro inoculadas com <i>Ralstonia solanacearum</i> . (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013). .... | 59            |
| <b>Tabela 7.</b> Incidência de folhas do tomateiro (%) pé-franco e enxertado em ambiente protegido infectado naturalmente com <i>Ralstonia solanacearum</i> . Fazenda Ituaú, Salto - SP, 2014.....  | 64            |
| <b>Tabela 8.</b> Número de frutos (NF-m <sup>2</sup> ) e massa total (kg-m <sup>2</sup> ) por classe do tomateiro avaliada. Salto – SP, 2014. Fazenda Ituaú, Salto – SP, 2014.....  | 69            |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Planta do tomateiro com sintomas da murcha bacteriana.....   | 12            |
| <b>Figura 2.</b> Teste do copo para o diagnóstico da murcha bacteriana.....   | 12            |
| <b>Figura 3.</b> Vista da casa de vegetação utilizada no experimento.....   | 22            |
| <b>Figura 4.</b> (A) Aparelho composto por duas lâminas de corte, utilizado na enxertia. (B) Método de enxertia garfagem por fenda cheia.....   | 23            |
| <b>Figura 5.</b> Clipe de enxertia utilizado para fixar a junção dos cortes.....  | 24            |
| <b>Figura 6.</b> Vista da câmara úmida, onde as mudas foram colocadas após o processo da enxertia.....  | 24            |
| <b>Figura 7.</b> Disposição dos vasos na bancada.....   | 25            |
| <b>Figura 8.</b> Transplante das mudas do tomateiro.....  | 25            |
| <b>Figura 9.</b> Tutoramento das plantas do tomateiro.....  | 25            |
| <b>Figura 10.</b> Ferimentos realizados nas raízes das plantas, com auxílio de estilete.....  | 26            |
| <b>Figura 11.</b> Inoculação do isolado TOM-3145 de <i>Rs</i> nos vasos de cultivo.....   | 26            |
| <b>Figura 12.</b> Sequência das operações realizadas na coleta do material para análise enzimática: (A) coleta das plantas, (B) embalagem e etiquetagem das amostras, (C) amostra pronta, (D) amostras acondicionadas em nitrogênio líquido.....              | 27            |
| <b>Figura 13.</b> (A) Plantas pé-franco „Pizzadoro“ e (B) plantas enxertadas „Muralha“ + „Pizzadoro“ inoculados.....  | 32            |
| <b>Figura 14.</b> (A) Plantas enxertadas „Woodstock“ + „Pizzadoro“ e (B) „Muralha“ + „Pizzadoro“.....   | 32            |
| <b>Figura 15.</b> Leituras com IRGA, (A) plantas do tomateiro enxertado e pé-franco (B).....  | 33            |
| <b>Figura 16.</b> Vista geral do ambiente protegido utilizado no experimento.....   | 34            |
| <b>Figura 17.</b> Vista geral do interior do ambiente protegido, após o transplante das mudas, no município de Salto - SP.....  | 37            |
| <b>Figura 18.</b> Vista geral do início da colheita dos frutos do tomateiro.....  | 38            |
| <b>Figura 19.</b> Incidência da murcha bacteriana nos tratamentos, aos 100 dias após o transplante. (A) pé-franco „Forty“, (B) planta enxertada „Woodstock“+ „Forty“, (C) planta enxertada „Muralha“+ „Forty“ e (D) planta enxertada „Guardião“+ „Forty“..... | 39            |
| <b>Figura 20.</b> Atividade enzimática da SOD ( $U \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) e CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) nas folhas do tomateiro. UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013.....                             | 43            |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 21.</b> Atividade enzimática da POD ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), PPO ( $\mu\text{mol catecol oxidado min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) e PAL ( $\mu\text{mols min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) nas folhas do tomateiro. UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013.....   | 46 |
| <b>Figura 22.</b> Atividade da SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) no caule (região de enxertia) do tomateiro. UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013.....  | 48 |
| <b>Figura 23.</b> Atividade enzimática da POD ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), PPO ( $\mu\text{mol catecol oxidado min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) e PAL ( $\mu\text{mols min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) no caule (região da enxertia) do tomateiro. UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013. ....   | 51 |
| <b>Figura 24.</b> Atividade da SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) no caule do tomateiro (abaixo e acima do ponto de enxertia). UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013.....   | 52 |
| <b>Figura 25.</b> Atividade enzimática da POD ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), PPO ( $\mu\text{mol catecol oxidado min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) e PAL ( $\mu\text{mols min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), no caule do tomateiro (abaixo e acima do ponto de enxertia). UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013.. .....   | 55 |
| <b>Figura 26.</b> Taxa de assimilação de $\text{CO}_2$ ( $A$ - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), ( $g_s$ ) condutância estomática ( $g_s, \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), ( $C_i$ ) concentração interna de $\text{CO}_2$ na folha ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$ ), ( $E$ ) taxa de transpiração ( $\text{mmol vapor d}''\text{ água m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), ( $EUA$ ) eficiência do uso da água ( $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) e ( $EC$ ) eficiência de carboxilação durante os dias de avaliações. UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2013 ..... | 62 |
| <b>Figura 27.</b> Produtividade de plantas pé-franco e enxertadas em solo naturalmente infectado com <i>R. solanacearum</i> em ambiente protegido. Fazenda Ituaú, Salto-SP.....   | 67 |

**RESPOSTA ENZIMÁTICA, FISIOLÓGICA E PRODUTIVA DO TOMATEIRO E DESEMPENHO DE PORTA ENXERTOS RESISTENTES À MURCHA BACTERIANA .** Botucatu, 2015. 85 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista.

Autor: EWERTON GASPARETTO DA SILVA

Orientadora: RUMY GOTO

## **1. RESUMO**

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) é uma das principais doenças do tomateiro. Não existe no mercado brasileiro cultivares/híbridos com nível de resistência satisfatório ao patógeno. Os porta-enxertos com resistência são utilizados com finalidade de controlar a murcha bacteriana. O patógeno tem a capacidade de permanecer no solo por muitos anos e com isso, inviabilizar o cultivo. Também influenciam nas trocas gasosas, na atividade das enzimas envolvidas em mecanismos de defesa e na produtividade das plantas afetadas. Diante do exposto, os objetivos do trabalho foram: avaliar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) como respostas bioquímicas ao estresse relacionado à defesa contra murcha bacteriana em tomateiro; avaliar a eficiência da enxertia no controle da murcha bacteriana; comparar as trocas gasosas das plantas enxertadas e não enxertadas com a doença, e avaliar a produtividade dessas plantas em ambiente protegido infestado com o patógeno. Para isso, conduziram-se três experimentos, sendo dois em casa de vegetação, na Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, Botucatu - SP e o terceiro em ambiente protegido, na Fazenda Ituaú, no município de Salto - SP. No primeiro experimento, foram avaliadas as atividades enzimáticas (SOD, CAT, POD, PPO e PAL) nas folhas e caule das plantas enxertadas e não enxertadas, inoculadas com *Rs* em nove coletas que foram realizadas às 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 288 horas após a inoculação. No segundo, avaliou-se a incidência da murcha bacteriana com 0, 5, 10, 15 e 20 dias após inoculação (DAI) e trocas gasosas com 0, 3, 6, 9 e 12 DAI em plantas enxertadas e não enxertadas inoculadas com *Rs*. No terceiro experimento, foi avaliada a incidência da murcha bacteriana aos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após transplante

em plantas enxertadas sobre três diferentes porta-enxertos e plantas pé-franco em ambiente protegido infestado naturalmente com a bactéria. Com base nos resultados obtidos nos experimentos, chegou-se às seguintes conclusões: As enzimas SOD, CAT e PAL, para as folhas, e SOD, POD e PAL, para o caule, podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos no tomateiro, em resposta à infecção da *Rs*, pois responderam ao estresse oxidativo gerado pelo patógeno nas plantas. Os porta-enxertos avaliados em casa de vegetação apresentaram resistência à doença; a murcha bacteriana reduziu as trocas gasosas no pé-franco e nas plantas enxertadas, sendo o pé-franco o mais afetado; a enxertia foi eficiente no controle da murcha bacteriana no ambiente protegido; os porta-enxertos mostraram-se resistentes à murcha bacteriana; a técnica de enxertia demonstrou viabilidade de produção dos tomates nas plantas enxertadas em comparação ao pé-franco, em solo contaminado com *Ralstonia solanacearum* em ambiente protegido.

---

PALAVRAS - CHAVE: Enxertia, *Ralstonia solanacearum*, Trocas gasosas, *Solanum lycopersicum* e Enzimas.

## **ENZYMATIC RESPONSE, PHYSIOLOGICAL AND PRODUCTIVE TOMATO AND ROOTSTOCK PERFORMANCE RESISTANT TO BACTERIAL WILT.**

Botucatu, 2015. 85 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista.

Author: EWERTON GASPARETTO DA SILVA

Adviser: RUMY GOTO

### **2. SUMMARY**

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) is one of major disease on tomato. There is no market cultivars / commercial hybrids resistant to the pathogen. Rootstocks with resistance are used in order to control bacterial wilt (BW). The pathogen can survive in the soil for many years. Also, to influence gas exchange, in the activity of enzymes involved in defense mechanisms and productivity of the affected plants. The above, the objectives of the study were to evaluate the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) as biochemical stress responses related to defense against bacterial wilt in tomato; evaluate the efficiency of grafting to control bacterial wilt; compare gas exchange of grafted and not grafted plants inoculated with BW and also check the productivity of these plants in plastic house with the pathogen. Three trial were conducted, two in a plastic house at the Faculty of Agricultural Sciences of Botucatu UNESP, and the third in a protected environment in Ituaú Farm in the Salto city. In the first trial, we evaluated the enzymatic activities (SOD, CAT, POD, PPO and PAL) in the leaves and stems of grafted and not grafted plants, inoculated with *Rs* in nine samples that were performed at 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 288 hours after inoculation. In the second, we evaluated the incidence of bacterial wilt with 0, 5, 10, 15 and 20 days after inoculation (DAI) and gas exchange with 0, 3, 6, 9 and 12 DAI on grafted and not grafted plants inoculated with *Rs*. The third trial it was evaluated the incidence of bacterial wilt at 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 days after transplantat in grafted plants on three different rootstocks and non grafted plants at soil naturally infested with *Rs*. Based on the results were concluded: The enzymes SOD, CAT and PAL, to the leaves, and SOD, POD and PAL for the stem, can be used as biochemical markers in tomato in response to *Rs*

infection because reaction to oxidative stress generated by the pathogen in plants; Rootstocks evaluated in greenhouse showed moderate levels of resistance. Bacterial wilt reduced gas exchange in non grafted and the grafted plants, but in the non grafted it was most affected. Grafting was effective in controlling bacterial wilt in the protected environment. The rootstocks were resistant to bacterial wilt. The grafting technique demonstrated feasibility of production of tomatoes in grafted plants compared to non grafted in soil contaminated with *Rs* in a protected environment.

---

KEYWORDS: Grafting, *Ralstonia solanacearum*, Gas exchanges, *Solanum lycopersicum* and Enzymes.

### 3 INTRODUÇÃO

O tomate ocupa o segundo lugar na produção entre as hortaliças cultivadas no Brasil, com uma produção de 4.275.070,00 toneladas e uma área cultivada de 65.178 hectares (AGRIANUAL, 2015).

O tomateiro, juntamente com o pimenteiro e o pepineiro são as principais hortaliças cultivadas em ambiente protegido. O cultivo nesse ambiente proporciona algumas vantagens, como, por exemplo, proteção em relação a adversidades climáticas (chuva, vento e geada), melhor aproveitamento dos fatores envolvidos na produção (água, fertilizantes, defensivos, manejo do ambiente), entre outros. No entanto, a falta de um manejo adequado do solo tem causado problemas relacionados ao acúmulo de sais (salinização) e, principalmente, a patógenos do solo.

As doenças de solo são preocupantes fontes de prejuízos para a cultura do tomateiro, em todas as regiões produtoras do Brasil. Pode levar à condenação dos campos de cultivo, especialmente em cultivos sucessivos, pois aumenta a pressão para surgimento de patógenos do solo (LOPES; DUVAL, 2007). Dentre os principais patógenos encontrados no solo, estão *Meloidogyne* spp, *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

A *Rs* é uma bactéria fitopatogênica encontrada no solo, causadora da murcha bacteriana que acarreta prejuízos em diversas culturas, grande número de espécies, possuindo mais de 200 hospedeiros com perdas econômicas difíceis de quantificar.

No tomateiro, é considerada uma das doenças mais importantes da cultura e de outras solanáceas. A bactéria é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, favorecida por alta temperatura e alta umidade do solo. Por isso, ocorre com maior intensidade durante os cultivos de verão chuvoso e no cultivo em ambiente protegido. Este, por sinal, tem trazido sérias preocupações aos produtores em virtude de sucessivos cultivos no mesmo local, aumentando a população da bactéria em áreas contaminadas.

Como uma alternativa de controle, a enxertia em porta-enxertos resistente tem-se mostrado promissora para cultivos em solos contaminados. Essa técnica consiste em isolar a cultivar e/ou híbrido que é suscetível à doença, por meio do porta-enxerto resistentes.

Contudo, as hipóteses do trabalho são de que a enxertia controla a murcha bacteriana no tomateiro, pela utilização de porta-enxertos resistente ao patógeno, que essas plantas enxertadas produzam mais que as plantas não enxertadas (pé-franco) em solo infectado com patógeno e que as trocas gasosas e as enzimas antioxidantes entre as plantas pé-franco e enxertadas (inoculadas com bactéria) sofram alterações em seu metabolismo pela manifestação da doença nessas plantas.

Diante das hipóteses apresentadas, objetivou-se com o trabalho: 1. Avaliar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) como respostas bioquímicas ao estresse relacionado à defesa contra *Rs* em tomateiro; 2. Avaliar a eficiência da enxertia no controle da murcha bacteriana; 3. Comparar as trocas gasosas das plantas enxertadas e não enxertadas inoculadas com *Rs*; 4. Avaliar a produtividade das plantas enxertadas e não enxertadas do tomateiro em ambiente protegido no solo infestado com o patógeno.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Cultura do tomateiro

O tomateiro é uma das hortaliças mais difundidas e de importância no mundo. Possui ampla capacidade adaptativa, o que o torna uma planta cosmopolita, podendo ser cultivada nas mais diferentes latitudes geográficas, cultivado a campo aberto ou em ambiente protegido, utilizando-se de diferentes tecnologias. A cultura do tomate no Brasil assume significativa importância social e econômica, o que o torna um dos maiores mercados de produção e comercialização (FARIAS, 2012).

O tomateiro, cuja espécie é *Solanum lycopersicum* L., pertencente à família da solanacea. Originou-se da espécie andina e silvestre *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme (TAYLOR, 1986), da parte ocidental da América do Sul, nas regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador. Foi levado para o México, que é considerado o centro da domesticação da espécie. No Brasil, foi introduzido no fim do século XIX por imigrantes europeus (ALVARENGA, 2004).

Seu cultivo está presente em praticamente todo o Brasil, destaque para os Estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais, que são os maiores produtores dessa hortaliça-fruto.

Segundo Filgueira (2008), o tomateiro é uma planta herbácea com caule flexível e incapaz de suportar a massa dos frutos e manter a posição vertical. As folhas são pecioladas, compostas por número ímpar de folíolos. Seu hábito de crescimento

é dividido em dois tipos, o indeterminado e o determinado. O indeterminado ocorre na maioria das espécies destinadas à produção do tomate de mesa, já o determinado, em sua grande maioria, é destinado ao processamento industrial.

Em cada fase do ciclo do tomateiro, existe uma temperatura considerada ótima, mas de maneira geral, temperaturas diurnas de 18° C a 25° C e noturnas de 15° C a 20° C são consideradas favoráveis para o bom desenvolvimento e a frutificação da cultura. Temperaturas inferiores a 12°C e acima de 35°C prejudicam o desenvolvimento vegetativo, e a frutificação, causando a deformação dos frutos e a formação de frutos ocos (FILGUEIRA, 2008).

As flores são pequenas e amarelas e agrupam-se em cachos. Não respondem ao fotoperíodo, desenvolvendo-se bem tanto em condições de dias curtos quanto de dias longos, entre 9 e 15 horas diárias de luminosidade. A umidade relativa (UR %) é outro fator essencial para o desenvolvimento do tomateiro. A UR adequada varia de 50 - 70%. UR inferior a 50%, associado com elevada temperatura, pode prejudicar a absorção de água e nutrientes pela planta (ALVARENGA, 2004).

O fruto é uma baga de tamanho e formato muito variáveis. É composto pela película (casca), placenta e sementes. Internamente, os frutos apresentam septos que delimitam os lóculos, nos quais as sementes se encontram imersas na mucilagem (FILGUEIRA, 2008).

Possui propriedade antioxidante do licopeno, pigmento carotenóide que confere coloração vermelha à maioria das cultivares (DORAIS; GOSSELIN; PAPADOPOULOS, 2001). É uma boa fonte das vitaminas A, B, C e de sais minerais, como fósforo, ferro, potássio e magnésio, e com baixo teor de calorías. O fruto possui em sua composição de 93 a 95% de água, e os restantes 5 a 7% encontram-se compostos inorgânicos (FILGUEIRA, 2008).

## **4.2 Ambiente protegido**

No Brasil, o ambiente protegido começou a ser utilizado a partir da década de 80. As primeiras estruturas foram implantadas no cinturão verde de São Paulo, cultivadas com tomate cereja, melão-rendilhado e pimentão-amarelo (VECCHIA; KOCH, 1999; MARTINS et al., 1999).

De acordo com Comitê Brasileiro de Desenvolvimento e Aplicação de Plásticos na Agricultura (COBAPLA), o Brasil possui 22 mil hectares de cultivo protegido (túneis e estufas), nos quais são produzidas hortaliças, flores e mudas (CULTIVO, 2014).

O cultivo em ambiente protegido proporciona algumas vantagens, como por exemplo, proteção em relação a adversidades climáticas (chuva, vento, geada), melhor aproveitamento dos fatores envolvidos na produção (água, fertilizantes, defensivos, microclima); além disso, podem propiciar cultivos na entressafra, permitindo um abastecimento mais regular do mercado (SANTOS et al., 2003).

O uso intenso dos solos, em ambiente protegido sem o manejo correto, fez com que estes ficassem salinizados e infestados por patógenos presentes no solo (GOTO; SANTOS; CAÑIZARES, 2003).

Em solos com desequilíbrio nutricional, patógenos relacionados à cultura são mais agressivos, sendo essa situação comum em cultivo protegido, por consequência de adubações pesadas associadas à ausência de lixiviação (LOPES, 1996). Muitas doenças em cultivos protegidos podem ser mais severas quando comparadas ao cultivo convencional; pois, além dos fatores ambientais mais favoráveis, devem-se considerar outros fatores como: estado nutricional, monocultivo, irrigação, entre outros, que contribuem para propiciar melhores condições para desenvolvimentos dos patógenos (ZAMBOLIN et al., 2000). Dentre os principais patógenos do solo, destaque para *R. solanacearum* que afeta diversas culturas, dentre as quais o tomateiro e outras solanáceas.

### **4.3 Murcha Bacteriana**

*Ralstonia solanacearum* é o agente causal da murcha bacteriana, doença vascular que está associada a mais de 200 espécies de plantas cultivadas e silvestres, em pelo menos 54 famílias botânicas (KELMAN, 1953; BUDDENHAGEN; KELMAN, 1964). Culturas de importância econômica, como tomate, batata, banana, fumo, pimentão, berinjela, pimenta, gengibre, amendoim, mandioca, amora, eucalipto, entre outras, são atacadas por esse patógeno (MIRANDA; TAKATSU; UESUGI, 2004).

Foi descrita pela primeira vez por Smith (1986), como *Bacillus solanacearum*. Pertence ao reino: Procariotae, divisão: Bactéria, classe: Proteobacteria,

subclasse: b-Proteobacteria, ordem: Burkholderiales, família: Burkholderiaceae. Essa nova classificação foi validada pelo International Journal of Systematic Bacteriology (YABUUCHI et al., 1995).

A bactéria é Gram-negativa, habitante do solo, em forma de bastonetes retos ou levemente curvados com aproximadamente 0,5-1,0 x 1,5-4,0 µm, não esporogênica, móvel por meio de um ou mais flagelos polares, aeróbica, faz parte do grupo das não fluorescentes, que não tem seu crescimento à temperatura de 40° C. Seu crescimento ocorre em temperatura entre 25° e 35°C, com temperatura ótima de 28° C (AGRIOS, 2005), mas isso pode variar de acordo com os isolados.

Foi relatada pela primeira vez no final do século 19, na cultura da batata, tabaco, tomate e amendoim, na Ásia, sul dos EUA e América do Sul (SMITH, 1896). Foi amplamente distribuída e é encontrada em regiões tropicais, subtropicais, e em algumas regiões temperadas do mundo (FEGAN; PRIOR, 2004).

Tradicionalmente, podem ser classificadas em cinco raças, de acordo com a gama de hospedeiros (DAUHTREY, 2003), e em cinco biovars, com base na utilização de três açúcares (lactose, maltose e celobiose) e três alcoóis (manitol, sorbitol e dulcitol), como fonte única de carbono (HAYWARD, 1964).

Estirpes da raça 1 caracterizam-se por afetar maior número de espécies hospedeiras, principalmente solanáceas. A raça 2 é patogênica a musáceas (bananeira triploide e *Heliconia* sp.). A raça 3 é composta por estirpes que infectam basicamente a cultura da batata. A raça 4 é característica de estirpes que afetam o gengibre. A raça 5 foi detectada na China (HE; SEQUEIRA; KELMAN, 1983).

No Brasil, levantamentos conduzidos nas diversas regiões geográficas indicaram a existência da biovar 1 em todas as regiões. A biovar 2 predomina em climas amenos (Sul, Sudeste, Centro-Oeste), e a biovar 3 no Norte e Nordeste. A raça 1, constituída pelos biovars 1 e 3, é responsável pela murcha bacteriana no tomateiro e em outras solanáceas (MALAVOLTA JR. et al., 2008).

Salanoubat et al. (2002) sequenciaram genoma de *R. solanacearum* da estirpe GMI1000, raça 1, mostrando que a estrutura genômica da bactéria divide em duas moléculas: cromossomo e megaplasmídeo. No cromossomo, estão os genes necessários para a sobrevivência da bactéria, como, por exemplo, os genes envolvidos nos processos de replicação e divisão celular. Já, no megaplasmídeo, encontram-se os genes que conferem características de adaptação e patogenicidade ao isolado.

Os principais fatores ambientais que interferem na interação patógeno-hospedeiro são a temperatura e a umidade do solo. Altas temperaturas favorecem o desenvolvimento da doença sob condições de campo, bem como sua sobrevivência no solo. Temperatura ótima entre 25 e 35° C favorecem o desenvolvimento da doença (TAKATSU; LOPES, 1997).

A bactéria *R. solanacearum* invade o hospedeiro através de injúrias das raízes ou em pontos de emergência de pelos radiculares e raízes laterais. As injúrias nas raízes podem ser provocadas por nematoides, ferramentas e implementos agrícolas utilizados nos tratos culturais, que facilitam a entrada da bactéria nas plantas.

Os sintomas iniciais da doença incluem o escurecimento da região vascular, mais visível na região próxima ao colo, murcha de folíolos e epinastia foliar, podendo ocorrer recuperação das plantas nas horas mais amenas do dia. Com a progressão da doença, esse estado de murcha afeta a planta toda, podendo inclusive levar à morte a planta infectada (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

A murcha das folhas (Figura 1) ocorre de cima para baixo nas plantas, resultado da interrupção parcial ou total do fluxo de água. Ao infectar a planta por ferimentos nas raízes, a bactéria aloja-se nos vasos condutores de água (xilema), multiplica-se, produzindo alta população de células, e polissacarídeos extracelulares viscosos, que acabam bloqueando o vaso do xilema, que é o vaso que conduz a água absorvida pelas plantas (DENNY, 2006; LOPES; ROSSATO, 2013).

A doença pode manifestar-se em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, embora seja mais comum na época da formação do primeiro cacho de frutos, mas isso pode variar em função do clima, da pressão do inóculo no solo, da cultivar utilizada, dentre outros fatores. Haward (1991) descreve que a temperatura é o fator mais importante entre os que afetam a interação patógeno-hospedeiro e que o aumento da temperatura para 30-35°C diurna causa a incidência e a severidade da murcha bacteriana, mas não para todas as estirpes do patógeno.

No campo, podem-se fazer testes rápidos para diagnosticar corretamente a doença. O teste do copo (Figura 2), em que se corta uma pequena porção (cerca de 5 cm) da parte mais inferior do caule de planta doente, colocando-a ligeiramente submersa em frasco transparente com água limpa. A presença de um filete leitoso saindo do tecido em direção ao fundo do copo indica que é murcha bacteriana.



Foto: Evertton G da Silva

**Figura 1.** Planta do tomateiro com sintomas da murcha bacteriana.



Foto: Carlos A. Lopes

**Figura 2.** Teste do copo para o diagnóstico da murcha bacteriana.

O controle da doença é muito difícil, especialmente com as condições de alta temperatura e umidade do solo, que favorecem o desenvolvimento da doença. A utilização da resistência genética representa um dos métodos de controle mais eficientes e econômicos, reduzindo, de forma expressiva, os prejuízos com a doença e o custo de produção (REZENDE; MARTINS, 2005). Além disto, a resistência genética de plantas é a forma principal de controle das murchas vasculares (AGRIOS, 2005).

#### 4.4 Trocas gasosas

A produtividade é influenciada por características morfológicas e fisiológicas da fonte (órgãos fotossintetizantes) e do dreno (órgãos consumidores). Toda a produção da massa seca depende da atividade fotossintética da fonte, e a assimilação do  $\text{CO}_2$  é apenas um dos fatores que influenciam no desenvolvimento vegetal (FOYER; GALTIER, 1996).

A fotossíntese é o processo mais importante para as plantas. Durante esse processo, as plantas utilizam a energia solar para converter moléculas simples (dióxido de carbono e água) em moléculas orgânicas, que podem ser utilizadas pelas

plantas como fonte de energia e de moléculas estruturais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A energia luminosa capturada e armazenada pelos vegetais superiores é utilizada em conjunto pelos complexos de pigmentos e pelo transporte sequencial de elétrons do fotossistema II (PSII) para o fotossistema I (PSI). A utilização da luz pelos fotossistemas regula as reações de fixação de CO<sub>2</sub> e geração de ATP, pelas reações luminosas (CHAGAS, 2007).

Patógenos vasculares afetam os processos fisiológicos das plantas hospedeiras (DALY, 1976). As relações hídricas de plantas doentes podem ser afetadas em função de distúrbios no funcionamento de estômatos, do aumento da resistência ao fluxo e/ou à absorção de água pelas raízes, tornando as plantas hospedeiras mais sensíveis à deficiência hídrica (SYVERTSEN; BAUSHER; ALBRIGO, 1980). Lesões necróticas no tecido foliar, desbalanço de nutrientes e patógenos são fatores, que em conjunto ou isoladamente, causam queda na fotossíntese, reduzindo a produtividade das plantas (DALY, 1976; DUNIWAY, 1976)

Do ponto de vista fisiológico, um dos principais danos causados pelos patógenos que atacam as folhas ocorre sobre os processos fotossintéticos, as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila. Essas têm sido consideradas indicadores úteis da atividade do aparelho fotossintético em plantas sob condições de estresse, como o causado por patógenos (BERGER et al., 2007).

#### **4.5 Enxertia em hortaliças**

A utilização da enxertia é conhecida pelos chineses há três mil anos em plantas lenhosas (MIGUEL, 1997). Em hortaliças, a técnica de enxertia iniciou-se em meados de 1920 no Japão e na Coreia, na cultura da melancia (*Citrullus lanatus*) como medida preventiva contra patógenos de solo (LEE, 1994). No entanto, a investigação mostrou que esta técnica pode ser eficaz contra uma variedade de doenças causadas por fungos, bactéria, vírus e nematóides. Além disso, muitos estudos têm mostrado que o uso desta tecnologia pode ser eficaz no controle de doenças do solo (BLETSOS, 2005; GIANNAKOU; KARPOUZAS, 2003).

Essa prática começou a se intensificar-se a partir de 1950 em berinjela (*Solanum melongena*), 1955 em melão (*Cucumis melo*) e 1965 em pepino (*Cucumis sativus*), todos objetivando o controle de patógenos de solo (KAWAIDE, 1985). Na Europa, a enxertia de hortaliças é utilizada desde a década de 40, pelos horticultores holandeses (MIGUEL, 1997).

No Brasil, acredita-se que a enxertia em hortaliças começou a ser realizada comercialmente na década de 80, na cultura do pepino, no Estado de São Paulo, visando ao controle de nematóides e na obtenção de frutos com menos cerosidade e mais brilhosos (GOTO, 2001). Em 2009, foram comercializadas, nos principais viveiros de hortaliças do estado de São Paulo, 2.347.670 mudas enxertadas de pimenteiro, 1.972.210 de pepineiro, 776.010 de tomateiro, 70.400 de berinjela, 3.400 de jiló e 7.500 de abobrinha Mini (GOTO, 2011).

Enxertia é o processo de união de duas porções de tecido vegetal vivo, visando ao crescimento e desenvolvimento de uma única planta (JANICK, 1966). O sucesso dessa técnica é conferido pela união morfológica e fisiológica entre enxerto (cavalo) e porta-enxerto (cavaleiro), com posterior e adequado crescimento e desenvolvimento (CAÑIZARES; GOTO, 2002).

No processo da enxertia, o tecido recém-cortado do enxerto, com atividade meristemática, coloca-se em contato seguro e íntimo com o tecido similar recém-cortado do porta-enxerto. Células externas da região do câmbio iniciam a produção de células parenquimáticas que, logo após, misturam-se e entrelaçam-se, formando o tecido do calo.

Nas combinações compatíveis, ocorre a reabsorção da capa necrótica antes da formação dos plasmodios secundários entre as células, perto dos feixes vasculares formados. Algumas células do calo diferenciam-se em novas células do câmbio. Essas novas células formam novo tecido vascular: xilema no interior e floema no exterior, estabelecendo-se, assim, a conexão vascular entre enxerto e porta-enxerto. Com frequência, no início da união, formam-se anastomoses, que são pontes entre os feixes vasculares, sendo que o câmbio só é reconstituído completamente ao final da segunda semana (JANICK, 1966).

O processo de união, em hortaliças, pode ser visível um dia após a enxertia e termina entre uma e três semanas, com a completa conexão entre xilema e floema. A formação do “calo” e a formação da união do enxerto terminam quando o

ferimento se cicatriza e estabelece a circulação de água e nutrientes da raiz para a parte aérea e de fotoassimilados da parte aérea para a raiz (CAÑIZARES, 2003).

Vários métodos de enxertia em hortaliças podem ser empregados, sendo os mais utilizados, a garfagem fenda cheia, garfagem simples, contato bisel e encostia. A escolha do método deve considerar, além da espécie, as vantagens e desvantagens de cada um, levando em consideração qual método é mais eficaz (CAÑIZARES; GOTO, 2002).

No início, muitos agricultores não tinham conhecimento do manejo nutricional das plantas enxertadas em cultivo protegido, promovendo assim, em muitos casos, a salinização do solo, devido ao uso excessivo de fertilizantes. Com o uso intensivo desses ambientes e a falta de prevenção com relação às doenças, principalmente por patógenos do solo, em muitos casos, inviabilizou-se a continuidade de cultivos nesses ambientes (GOTO, 2011).

Dentre os vários patógenos de solo que têm inviabilizado o cultivo de hortaliças em cultivo protegido, em razão das estruturas de resistência que permanecem no solo por um longo período, destacam-se *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora capsici*, *Meloidogyne* sp (ZAMBOLIN; CASA; REIS, 1999).

A enxertia tem por finalidade evitar o contato da planta suscetível com solo contaminado, ou seja, enxerta-se a cultivar comercial sobre porta-enxerto resistente. O porta-enxerto resistente mantém-se sadio, assumindo a função de absorver água e nutrientes do solo, ao mesmo tempo em que isola a cultivar sensível do patógeno (PEIL, 2003). Pode influenciar na precocidade da frutificação, na qualidade e na maturidade dos frutos e, conseqüentemente na produtividade das plantas (CAÑIZARES; VILLAS BÔAS, 2003). Pode influenciar ainda nas características de frutos, forma, cor e textura da casca ou da polpa e no teor de sólidos solúveis (LEE, 1994).

Segundo Goto et al. (2003), a finalidade da enxertia dependerá da condição em que se deseja produzir, ou seja, a mesma poderá visar ao controle isolado ou conjunto de doenças, à tolerância a temperaturas adversas, à salinidade do solo, ao vigor, a desordens fisiológicas das plantas e à produção de frutos de melhor qualidade.

As doenças de solo tornam-se um grande desafio para os produtores que cultivam plantas em ambiente protegido, portanto a obtenção de variedades resistentes tem sido uma alternativa importante para o controle de raças fisiológicas,

estirpes ou grupos de diferentes patógenos do solo. Sendo assim, a adoção da enxertia utilizando porta-enxerto resistente, com boas características comerciais, constitui-se numa alternativa de controle em menor prazo (SANTOS et al., 2003).

#### **4.6 Enzimas envolvidas no mecanismo de defesa das plantas**

As espécies reativas de oxigênio (EROS) ocorrem normalmente no metabolismo celular e possuem várias funções na resposta de defesa da planta. O  $H_2O_2$  pode ser diretamente tóxico ao patógeno e está envolvido com o fortalecimento da parede celular, uma vez que é utilizado para a biossíntese de lignina, atua também como mensageiro secundário, ativando vários mecanismos, inclusive os relacionados à defesa das plantas, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas à célula. Esses radicais podem reagir com proteínas e assim, reduzir a atividade de enzimas, reagirem com lipídios e aumentar a permeabilidade de membranas e ainda reagir com o DNA causando mutações (MOLLER, 2001).

O acúmulo de EROS pode resultar em prejuízos consideráveis ao metabolismo celular dessas plantas. A célula dispõe de vários mecanismos para eliminar eficientemente essas espécies reativas de oxigênio. Moléculas antioxidantes atuam na detoxificação, podem estar envolvidos na proteção celular contra esses radicais livres acumulados (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; YOSHIMURA et al., 2004; MURGIA et al., 2004). Esta defesa é de natureza química e pode atuar na síntese de metabólitos secundários tóxicos aos patógenos, espécies reativas de oxigênio e ativação de genes que codificam proteínas, entre outros (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Quando atacadas, as plantas têm de responder de forma rápida a essa “explosão oxidativa”, que constitui na produção EROS, principalmente ânion superóxido ( $O_2^{\circ-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (HU et al., 2009). Diversos fatores contribuem para a formação das EROS. Scandalios et al. (2000) cita radiação UV, luminosidade, herbicidas, ataque de patógenos e flutuações na temperatura. Mallick e Mohn (2000) relataram outros fatores, como seca, metais pesados, concentração elevada de sais e poluição do ar.

Durante o contato inicial entre o patógeno e a célula vegetal, podem ser produzidas EROS nos estádios posteriores da patogênese. Durante a interação

planta-patógeno, a produção acontece em três fases: Fase I: ocorre o reconhecimento das moléculas do patógeno, que podem ser carboidratos ou proteínas. Através desse reconhecimento, começam os eventos de transdução de sinais. Fase II: iniciam os vários processos relacionados à defesa, e nessa fase não há sintomas visíveis da doença. Os processos de defesa incluem aumento de antioxidantes, ação de lipoxigenases, produção de fitoalexinas, lignificação e resistência sistêmica adquirida. A fase III compreende o processo de evolução da patogênese, levando ao desenvolvimento de sintomas visíveis (BAKER; ORLANDI, 1999).

Segundo Pandhair e Sekhon (2006), estresses bióticos e abióticos em plantas podem gerar grande quantidade de EROS, tendo certa dificuldade do sistema de defesa da planta em eliminá-los, ativando assim o processo de morte celular ou aumentando a resposta sistêmica de resistência a patógenos.

Para sobreviver às condições de estresse, que frequentemente são impostas pelo ambiente, as plantas desenvolveram sistemas de remoção das EROS, e possuem dois sistemas de defesa antioxidante: um enzimático e outro não enzimático. O mecanismo enzimático é composto pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), glutathione peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GSTs). Já o mecanismo não enzimático é formado por glutathione, ascorbato, tocoferol, flavonoides, alcaloides e carotenoides (SCANDALIOS, 2005).

A SOD (EC 1.15.1.1) é a primeira enzima da linha de defesa das plantas contra as EROS nas células, entre organismos que consomem oxigênio (OLMOS et al., 2003). Três tipos distintos de isoenzimas SOD têm sido detectados em plantas, que são classificados de acordo com seu metal cofator Fe, Mn e Cu/Zn (GRATÃO et al., 2005). As Cu/Zn-SOD localizadas no citosol e cloroplastos, Fe-SOD localizadas nos cloroplastos e Mn-SOD localizadas na matriz (SCANDALIOS, 2005).

A enzima trabalha catalisando a dismutação do superóxido  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  (SCANDALIOS, 2005) e  $O_2$ , representando, assim, um dos principais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo celular.

A CAT (EC 1.11.1.6) converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , e nas plantas elas são encontradas no peroxissomos e glioxissomas. São separadas em três classes: Na classe I - responsáveis por remover o  $H_2O_2$  produzido durante a fotorrespiração, são encontradas no tecido fotossintético; Classe II - localizada no tecido vascular participa do

processo de lignificação e, por fim, a classe III – encontradas em sementes e plantas degradam o  $H_2O_2$  produzido durante a degradação dos ácidos no glioxissoma (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

As catalases funcionam como um canal de “limpeza” do  $H_2O_2$  (BREUSEGEM et al., 2001). Segundo Mittler et al. (2004), além da CAT, POD e SOD também atuam na remoção das EROS. Nos tecidos infectados de plantas, uma redução da atividade da catalase levaria ao aumento do  $H_2O_2$ , que poderia provocar a morte celular, que caracteriza a resposta de hipersensibilidade (HR), (MARGIS – PINHEIRO et al., 1999).

A enzima POD (EC 1.11.1.7) está envolvida em diversas reações celulares, como a oxidação de compostos fenólicos, ligação de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético (LEE; KIM; LEE, 2001), lignificação, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos (HIRAGA et al., 2001). Catalisam a oxidação de grande variedade de substratos através da reação com  $H_2O_2$  (YOSHIDA et al., 2003).

Conforme suas propriedades estruturais e catalíticas podem ser divididas em três classes: Classe I - enzimas intracelulares em plantas, bactérias e leveduras, como a citocromo *c* peroxidase e ascorbato peroxidase de cloroplasto e citosol. Classe II - enzimas extracelulares de fungos, e a Classe III - constituída por peroxidases que são secretadas no apoplasto (HIRAGA et al., 2001). Os estudos reforçam a hipótese de que a classe III tem um importante papel na defesa de plantas e que pode servir como marcador enzimático em resposta a estressores bióticos (SAATHOFF et al., 2013).

A POD possui importante papel na biossíntese da parede celular, aumentando as barreiras mecânicas contra ataque de patógenos, tornando a penetração do patógeno mais lenta (CAMPA, 1991). O processo de lignificação pela enzima é observado em muitas espécies de plantas em resposta à infecção por agentes patogênicos (STICHER; MAUCHI-MANI; MÉTRAUX, 1997). A atividade da enzima tem sido demonstrada porque pode ser induzida por fungos, bactérias e vírus (BABU et al., 2008; HIRAGA et al., 2000).

A enzima Polifenoloxidase (PPO) (EC 1.14.18.1) participa do grupo das oxirredutases, contém o cobre como grupo prostético, e esta relacionada com oxidação de compostos fenólicos (MENDONÇA; GUERRA, 2003). Esses compostos são substâncias advindas de produtos secundários, que contém um grupo fenol, isto é, um

grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Elas são produzidas pelas plantas e apresentam uma variedade de funções nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

PPOs são codificadas por genes nucleares, estão localizadas nos plastídios e separadas de seus substratos (compostos fenólicos), que estão localizados principalmente nos vacúolos, e têm atividade só quando liberados no rompimento celular (HUNT et al., 1993). Em decorrência desse fato, acredita-se que o principal papel dessas enzimas em plantas é de defesa contra microrganismos, insetos e mamíferos herbívoros (APPEL, 1993; STEFFENS; HAREL; HUNT, 1994). Quanto maior a atividade da enzima PPO, maiores concentrações de produtos tóxicos da oxidação serão obtidos, os quais conferem resistência às infecções (AGRIOS, 2005).

Outra função da enzima é de lignificação, ligada à proteção das plantas, devido à ação tóxica de quinonas reativas, produzidas da catálise de compostos fenólicos (MAYER; STAPLES, 2002). As quinonas são consideradas substâncias bactericidas e fungicidas, sendo altamente tóxicas aos microrganismos patogênicos (CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

Cavalcanti et al. (2005) mencionam POD,  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia liase (PAL) e polifenoloxidase (PPO), que são enzimas relacionadas ao estresse provocado por patógenos. Yoruk e Marshall (2003) relatam que vários estudos foram realizados sobre o papel da PPO na proteção de plantas, contra doenças e insetos, baseadas nas observações que os produtos secundários da reação da PPO previnem a expansão da infecção.

A enzima PAL (EC 4.3.1.5) é reguladora da síntese de compostos fenólicos, sendo estes precursores da lignina e do ácido salicílico, que atuam na defesa estrutural e no processo de sinalização da resposta sistêmica (BONAS; LAHAYE, 2002). É a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas, devido à importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos. É responsável pela desaminação do aminoácido L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos, ácidos *p*- cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (SCHWAN-ESTRADA; STANGALIRN; PASCHOLATI, 2008).

O acúmulo de substâncias de natureza fenólica em plantas submetidas ao estresse parece ser consequência do aumento da atividade da PAL, o que resulta geralmente em aumento na atividade de outras enzimas, como, por exemplo, PPO e

POD (GASPAR et al., 1985). É regulada por fatores como nutrição, luz e infecção por patógenos. Entre as substâncias formadas pela enzima, está o ácido benzoico, que dá origem ao ácido salicílico, um importante composto na defesa das plantas contra patógenos (CASTRO; KLUGE, PERES, 2005).

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

**5.1 Experimento I: Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) , catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) em plantas de tomateiro enxertados inoculados e não inoculados com *R. solanacearum***

### **5.1.1 Localização do experimento**

Conduziu-se o experimento entre os meses de fevereiro e março de 2013, em casa de vegetação (Figura 3), no Departamento de Horticultura da FCA/UNESP, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista - Câmpus Botucatu, Botucatu – SP.

A localidade possui as seguintes coordenadas geográficas: 22° 49'' latitudes sul e 48° 25'' longitude oeste, altitude de 770 m. O clima da região, segundo a classificação de Köppen é do tipo **Cwa**, ou seja, inverno seco e verão quente.



**Figura 3.** Vista da casa de vegetação utilizada no experimento.

### 5.1.2 Delineamento experimental e tratamentos

Utilizou-se o delineamento experimental dos tratamentos em parcela subdividida.

Adotaram-se nas unidades experimentais os tratamentos, pé-franco („Pizzadoro“) e planta enxertada („Muralha“ + „Pizzadoro“) e nas subparcelas nove épocas de coletas (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 288 horas após inoculação), com 18 tratamentos e quatro repetições, somando 72 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso com quatro plantas cada. Os tratamentos foram testados em solo inoculado com *Ralstonia solanacearum* e em solo sem inoculação (controle).

### 5.1.3 Relação de cultivares de enxertos e porta-enxertos de tomateiro

As informações obtidas dos catálogos das respectivas empresas com relação à resistência a doenças dos híbridos utilizados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição de híbridos porta-enxerto „Muralha“ e do enxerto „Pizzadoro“ utilizados no experimento. Botucatu, UNESP, 2013.

| <b>Porta-enxerto</b> | <b>Empresa</b> | <b>**Resistências</b>              |
|----------------------|----------------|------------------------------------|
| Muralha              | Takii          | Rs, V, Fol, Forl, Ma, Mi, Mj, ToMV |
| <b>Enxerto</b>       |                |                                    |
| Pizzadoro            | Nunhems        | V, Fol, Pb, Ma, Mi, Mj, ToMV.      |

\*\*Resistências: Rs: Murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*); V: Murcha de verticílio (*Verticillium* spp.); Fol: Murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*); Pb: Pinta bacteriana (*Alternaria* sp.); Forl: Podridão da coroa e da raiz (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*); ToMV: Vírus do mosaico do tomateiro (*Tomato mosaic virus*); Ma: (*Meloidogyne arenaria*); Mi: (*Meloidogyne incognita*); Mj: (*Meloidogyne javanica*).

#### 5.1.4 Produção das mudas

O porta-enxerto e enxerto foram semeados respectivamente no dia 26-12-2013. Utilizou-se bandeja plástica de 162 células e o substrato utilizado foi o Tropstrato<sup>®</sup>. As mudas foram produzidas na Empresa Sakata Seed Sudamerica, no município de Bragança Paulista-SP.

A enxertia foi realizada no dia 15-01-2013 pelo método de garfagem por fenda cheia. Esse método consiste em se fazer cortes no enxerto e no porta-enxerto com auxílio de um aparelho composto por duas lâminas (Figura 4 A). A operação do corte no porta-enxerto faz-se acima das folhas cotiledonares e no enxerto, quando apresentarem 3- 4 folhas (Figura 4 B). Para melhor cicatrização do enxerto, foram usados cliques de enxertia (Figura 5), para envolver o ponto de junção das plantas enxertadas (GOTO et al., 2003).

Após a realização da enxertia, as mudas foram levadas para a câmara úmida (Figura 6), feita com tela de sombreamento (70%) e filme transparente de polietileno de baixa densidade (PEDB), transparente por um período de 10 dias, mantendo-se a umidade relativa próxima a 100 % e fazendo-se a troca de ar quente, ou seja, abertura do plástico da câmara de três a quatro vezes no dia. Esse processo de levar as mudas para a câmara é muito importante para a cicatrização do ponto de enxertia.

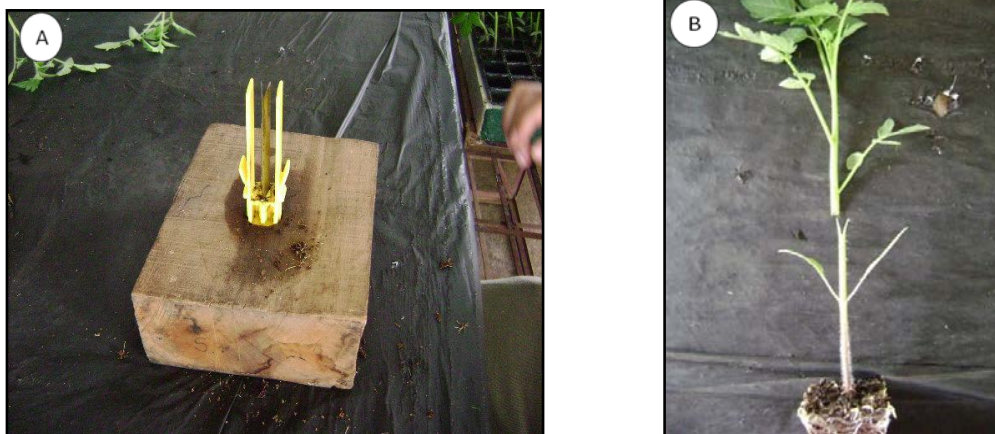


Foto: Ewerton G da Silva

**Figura 4.** (A) Aparelho composto por duas lâminas de corte, utilizado na enxertia. (B) Método de enxertia garfagem por fenda cheia.



**Figura 5.** Clipe de enxertia utilizado para fixar a junção dos cortes.



Foto: Ewerton G da Silva

**Figura 6.** Vista da câmara úmida, onde as mudas foram colocadas após o processo da enxertia

### 5.1.5 Preparo do solo e transplante

O solo utilizado no enchimento dos vasos foi constituído da seguinte maneira: solo (67%), composto orgânico (Provaso<sup>®</sup> - 22%), substrato comercial Tropstrato<sup>®</sup> (11%), previamente autoclavado e enriquecido com termofosfato (0,95 g) + superfosfato simples (0,85 g) + cloreto de potássio (0,20 g), por litro de substrato. Utilizaram-se vasos com capacidade de 4 litros e colocados em bancadas conforme apresentado na figura 7.

O transplante das mudas (Figura 8) ocorreu no dia 07-02-2013, vinte e três dias após a enxertia momento em que as mesmas apresentavam boa

cicatrização no local da enxertia. Foram transplantadas quatro mudas por vaso. O sistema de irrigação utilizado nos vasos foi por gotejamento (autocompensante), de modo que os tratamentos receberam a mesma quantidade de água. O tutoramento das plantas foi realizado com auxílio de fitilhos (Figura 9).



**Figura 7.** Disposição dos vasos na bancada.



**Figura 8.** Transplante das mudas do tomateiro.



**Figura 9.** Tutoramento das plantas do tomateiro.

Foto: Ewerton G da Silva

### 5.1.6 Preparo e inoculação da *R. Solanacearum*

Para o preparo do inóculo, foi utilizado o isolado TOM-3145 de *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), proveniente da coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, FCA/UNESP, oriundo da empresa Sakata Seed Sudamérica. O mesmo foi cultivado em meio de tetrazolium (peptona - 10,0 g; glicose - 5,0 g; caseína hidrolisada - 1,0 g; solução de tetrazolium a 1% - 5,0 mL; ágar - 15,0 g; água destilada-q.s.p; 1.000 mL, pH 7,0) durante 48 horas, em estufa a 27 °C.

As colônias de bactérias patogênicas (brancas) foram selecionadas e repicadas para o meio NSA (peptona – 5,0 g de extrato de carne – 3,0 g de sacarose – 5,0 g de ágar – 15,0 mL de água destilada- q.s.p. .1000 mL) nas mesmas condições anteriores, para a obtenção do inóculo.

Para a inoculação, foi preparada uma suspensão bacteriana em água destilada ajustada por colorimetria ( $A_{540\text{ nm}} = 0,1$ ) à concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (WILLIAMSON et al., 2002).

A inoculação foi realizada no dia 14-02-2013, sete dias após transplante das mudas, tempo suficiente para o enraizamento das mesmas no solo. Para procedimento da inoculação, primeiramente foram realizados vários ferimentos nas raízes com auxílio de um estilete esterilizado (Figura 10) e posteriormente adicionados cinco mL da suspensão de inóculo no solo, ao redor do colo de cada planta (Figura 11). Nas plantas não inoculadas, realizaram-se os mesmos procedimentos de ferimentos nas raízes da plantas e posteriormente adicionaram-se 5 mL de água destilada estéril no solo, ao redor de cada planta.



Foto: Ewerton G da Silva

**Figura 10.** Ferimentos realizados nas raízes das plantas, com auxílio de estilete.



Foto: Ewerton G da Silva

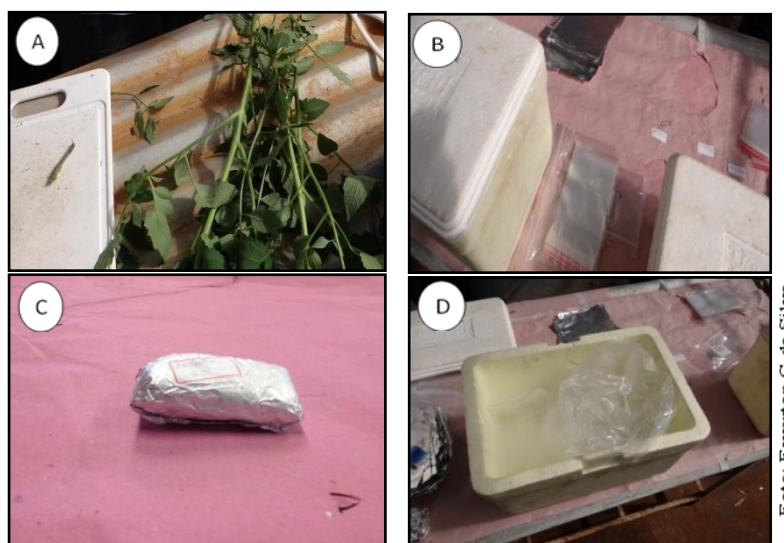
**Figura 11.** Inoculação do isolado TOM-3145 de *Rs* nos vasos de cultivo.

### 5.1.7 Coletas das plantas para análises bioquímicas

Realizaram-se coleta destrutiva das plantas durante as nove coletas. Coletou-se caule e folhas para as determinações enzimáticas. Nas plantas enxertadas, o caule foi dividido em três partes, abaixo, região e acima da enxertia. Nas plantas de pé-franco, utilizou-se somente uma amostra na parte mediana do caule. As folhas foram coletadas do terço médio da planta (segunda e terceira folhas completamente desenvolvidas). Adotou-se esse mesmo procedimento nas épocas de coleta do material vegetal, adotando assim, um procedimento padrão de amostragem.

Durante as coletas, o material foi colocado em embalagens plásticas, envolto em papel- alumínio e acondicionado em caixa de poliestireno expandido

com nitrogênio líquido para a paralisação das reações metabólicas e, posteriormente, armazenado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figuras 12- A, B, C e D).



**Figura 12.** Sequência das operações realizadas na coleta do material para análise enzimática. (A) Coleta das plantas; (B) embalagem e etiquetagem das amostras; (C) Amostra pronta; (D) Amostras acondicionadas em nitrogênio líquido.

### 5.1.8 Determinação das atividades enzimáticas

- **Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada pelo método Beauchamp e Fridovich (1973), avaliando a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) em um meio de reação composto por metionina  $5\text{ mmol L}^{-1}$ , EDTA  $0,66\text{ mmol L}^{-1}$ , NBT  $33\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  e riboflavina  $0,00165\text{ mmol L}^{-1}$ , em  $3,0\text{ mL}$  de fosfato de potássio  $50\text{ mM}$  (pH 7,8).

A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi determinada pelo espectrofotômetro a  $560\text{ nm}$ . Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. A atividade enzimática foi expressa em  $\text{U }\mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

- **Catalase (CAT)**

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada por adaptação do método de Kar e Mishra (1976), e o ensaio foi composto de 150  $\mu\text{L}$  de amostra, que foi extraída em tampão fosfato de potássio + EDTA + DTT + PVPP 100  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,5. Utilizou-se de 1.950  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,5) como tampão de determinação e 750  $\mu\text{L}$  de solução de peróxido de hidrogênio 50 mM como substrato enzimático. As leituras foram em espectrofotômetro a 240 nm. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

- **Peroxidase (POD)**

A atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método descrito por Allain et al. (1974), modificado por (LIMA; BRASIL; OLIVEIRA, 1999).

O extrato enzimático foi obtido através da homogeneização de 300 mg de tecido foliar e do caule, macerado em nitrogênio líquido e acrescido de 5 mL de tampão acetato do sódio pH 5,0 (gelado), seguido de centrifugação durante 10 minutos a 10.000 x g, a 4°C, e 1 mL do sobrenadante foi usado como fonte de enzima em tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL de solução A (peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 30% + tampão fosfato de potássio pH 6,7) e 0,5 mL de solução B (163 mg de fenol + 81,3 mg de aminoantipirina em 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C, durante 5 minutos, sendo a reação interrompida, colocando-se as amostras em água quente por três minutos. Após essa etapa, o extrato foi analisado, realizando a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 505 nm e expresso em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

- **Polifenoloxidase (PPO)**

A atividade da polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) foi determinada pelo método descrito por Kar e Mishra (1976), e modificada por Lima et al., (1999).

O extrato enzimático foi obtido através da homogeneização de 300 mg de tecido foliar e do caule, macerado em nitrogênio líquido e acrescido de 5 mL de tampão acetato do sódio pH 5,0 (gelado), seguido de centrifugação durante 10 minutos a 10.000 x g, a 4°C, e 0,3 mL do sobrenadante foi usado como fonte de enzima em tubos de ensaio, juntamente com 1,85 mL de solução de catecol (pyrocatecol 0,1 M em tampão fosfato pH 6,7), e os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C durante 30 minutos, sendo a reação interrompida, colocando-se as amostras na água quente por três minutos.

Após essa etapa, o extrato foi analisado, sendo a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 395 nm. A atividade enzimática foi obtida em  $\mu\text{mol catecol oxidado min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

- **Fenilalanina amônia liase (PAL)**

A atividade da PAL (EC 4.3.1.5) foi determinada pelo método adaptado de Peixoto et al. (1999). Foram misturados 200 mg de amostra com 10 mL de 0,1 M de tampão de borato (pH 8,8), contendo 1,2 mL de  $\beta$  mercaptoetanol, 50 g (5%) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Esta mistura foi centrifugada por 20 minutos a 4°C (12.500 x g) e depois filtrada em lã de vidro, para obter o extrato.

A reação foi iniciada pela adição de 1 mL do extrato + 1 mL de tampão borato 0,2 M (pH 8,8) e 1 mL de fenilalanina após 5 minutos de banho-maria. Na amostra-controle, o extrato foi substituído por 1 mL tampão borato 0,1M. A reação foi finalizada pela adição de 0,1 mL (100  $\mu\text{L}$ ) de HCl 6N. A leitura foi feita a 290 nm em espectrofotômetro. Um coeficiente de extinção de 104  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  foi utilizado para calcular a atividade de PAL, que foi expressa em  $\mu\text{mols min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

### **5.1. 9 Análise estatística**

Efetou-se a análise de variância (teste F), e quando significativo, realizou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. Os dados foram analisados com auxílio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 1998).

## **5.2 EXPERIMENTO II: Avaliação da incidência da murcha bacteriana e trocas gasosas no tomateiro inoculado com *Ralstonia solanacearum***

### **5.2.1 Localização do experimento**

Conduziu-se o experimento entre os meses de fevereiro e março de 2013, em casa de vegetação, no Departamento de Horticultura da FCA/UNESP, conforme descrito no item 5.1.1 (Experimento I).

### **5.2.2 Delineamento experimental e tratamentos**

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizados, com os tratamentos delineados em parcela subdividida.

Adotou-se na unidade experimental (U.E) os tratamentos, pé-franco „Pizzadoro“ e as plantas enxertadas („Muralha“ + „Pizzadoro“, „Woodstock“ + „Pizzadoro“). Nas subparcelas, cinco épocas de avaliações [0, 5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI) para incidência da murcha bacteriana], com dez repetições e [0, 3, 6, 9 e 12 DAI], com cinco repetições para as trocas gasosas, utilizou-se um vaso por repetição.

### **5.2.3 Relação de cultivares de enxerto e porta-enxerto de tomateiro**

As informações obtidas dos catálogos das respectivas empresas com relação à resistência a doenças dos híbridos utilizados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Descrição de híbridos porta-enxerto „Muralha“ e „Woodstock“ e enxerto „Pizzadoro“ utilizados no experimento. Botucatu, UNESP, 2013.

| Porta-enxerto | Empresa | Resistências                                      |
|---------------|---------|---|
| Muralha       | Takii   | **Rs, V, Fol, Forl, Ma, Mi, Mj, ToMV              |
| Woodstock     | Sakata  | * Rs, V, Fol (1 e 2), Mi e Mj (1, 2, 3 e 4), ToMV |
| Enxerto       |         |   |
| Pizzadoro     | Nunhems | V, Fol, Pb, Ma, Mi, Mj, ToMV.                     |

\*\*Resistente \* Moderadamente resistente: Rs: Murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*); V: Murcha de verticílio (*Verticillium* spp.); Fol: Murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*); Pb: Pinta bacteriana (*Alternaria* sp.); Forl: Podridão da coroa e da raiz (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*); ToMV: Vírus do mosaico do tomateiro (*Tomato mosaic virus*); Ma: (*Meloidogyne arenaria*); Mi: (*Meloidogyne incognita*); Mj: (*Meloidogyne javanica*).

#### 5.2.4 Preparo do solo, produção das mudas e transplante

O substrato (solo) utilizado nos vasos, a produção das mudas e o transplante foram feitos igualmente, como descritos nos itens 5.1.4 e 5.1.5 (Experimento I).

#### 5.2.5 Preparo e inoculação da *R. Solanacearum*

Os procedimentos para o preparo do inóculo (isolado TOM-3145 de *Ralstonia solanacearum*) e a inoculação da suspensão bacteriana nas plantas do tomateiro foram os mesmos como descritos no item 5.1.6 (Experimento I).

#### 5.2.6 Avaliação da incidência da murcha bacteriana

Foram avaliadas as três plantas do vaso das dez repetições por tratamento. Das três plantas avaliadas, tirou-se a média da incidência da doença para cada repetição, em cada dia de avaliação. O cálculo da incidência da doença foi feito conforme fórmula descrita a seguir (SILVA; PASCHOLATI; BEBENDO, 2007).

$$\text{Sintomas (\%)} = \frac{\text{Número de folhas murchas} \times 100}{\text{Número total de folhas da planta}}$$

Incidência da murcha bacteriana 12 dias após inoculação nos tratamentos pé-franco e enxertados (Figura 13 e 14).



**Figura 13.** (A) Plantas pé-franco „Pizzadoro“ e (B) plantas enxertadas „Muralha“ + „Pizzadoro“ inoculados.



**Figura 14.** (A) Plantas enxertadas „Woodstock“ + „Pizzadoro“ e (B) „Muralha“ + „Pizzadoro“.

### 5.2.6 Trocas Gasosas

As medidas foram realizadas das 8 às 11 horas da manhã, utilizando o medidor portátil de fotossíntese, com sistema aberto e analisador de CO<sub>2</sub> por radiação infravermelha Infra Red Gas Analyser (IRGA) modelo LI-6400 da LI-COR. A Figura 15 ilustra o momento da leitura com o aparelho nas plantas pé-franco e enxertadas.

Foram avaliadas a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), concentração interna de CO<sub>2</sub> na folha ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Essas medidas foram calculadas pelo programa de análise de dados do equipamento medidor de fotossíntese, que utiliza a equação geral de trocas gasosas de Von Caemmerer e Farquhar (1981).

A eficiência do uso da água ( $EUA$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) foi determinada através da relação entre assimilação de CO<sub>2</sub> e taxa de transpiração ( $A/E$ ) e a eficiência de carboxilação foi determinada através da relação entre taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e concentração interna de CO<sub>2</sub> na folha ( $A/C_i$ ).

Nas avaliações das trocas gasosas, foi escolhida uma planta por vaso para a realização das medidas em cada repetição do tratamento.



**Figura 15.** Leituras com IRGA, (A) plantas do tomateiro enxertado e pé-franco (B).

### 5.2.8 Análise estatística

Foi realizado o teste de homogeneidade de Levene, indicando a necessidade de transformação dos dados ( $\sqrt{(x + 0,5)^{0,5}}$ ) somente para a incidência da murcha bacteriana (%).

Efetuuou-se a análise de variância (teste F) para os tratamentos, e quando significativo, realizou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias. Para as avaliações no tempo, foi efetuada a análise de regressão. Os dados foram analisados com auxílio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 1998).

### **5.3 EXPERIMENTO III: Avaliação da incidência da murcha bacteriana e produção do tomateiro em diferentes porta-enxertos, em solo contaminado naturalmente com *R solanacearum* em ambiente protegido no município de Salto - SP.**

#### **5.3.1 Localização do experimento**

Conduziu-se o experimento entre os meses de abril e agosto de 2014, em área comercial de produção de tomateiro em ambiente protegido. A estrutura era do tipo arco, de 5 x 40 m e altura do pé direito de 3 m, coberto por filme de polietileno de baixa densidade (PEBD), transparente com 100 µm de espessura (Figura 16), na fazenda Ituaú, localizada na cidade de Salto - SP.

A localidade possui as seguintes coordenadas geográficas: 23° 12' latitudes sul e 47° 17' 11" longitude oeste, altitude de 540 m, clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwa, ou seja, inverno seco e verão quente.



**Figura 16.** Vista geral do ambiente protegido utilizado no experimento.

### 5.3.2 Análise e preparo do solo

Para determinar a necessidade de calagem e adubação, foram coletadas 15 amostras simples de 0-20 e 20-40 cm de profundidade e feita amostra composta para cada profundidade. Posteriormente, as mesmas foram enviadas ao Laboratório do Departamento de Recursos Naturais – Setor Ciência do Solo, da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP de Botucatu.

**Tabela 3.** Resultados da análise química do solo. Botucatu, UNESP, 2013.

| (cm)  | pH                | M.O                | P <sub>resina</sub> | H+Al   | K   | Ca  | Mg | SB  | CTC | V% |
|-------|-------------------|--------------------|---------------------|--|-----|-----|----|-----|-----|----|
|       | CaCl <sub>2</sub> | g dm <sup>-3</sup> | mg dm <sup>-3</sup> | ----- mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ----- |     |     |    |     |     |    |
| 0-20  | 6,4               | 28                 | 205                 | 15   | 5,0 | 133 | 28 | 166 | 181 | 91 |
| 20-40 | 6,1               | 29                 | 229                 | 15   | 4,5 | 136 | 22 | 163 | 178 | 92 |

| Amostra | Boro                            | Cobre | Ferro | Manganês | Zinco |
|---------|---------------------------------|-------|-------|----------|-------|
|         | ----- mg dm <sup>-3</sup> ----- |       |       |          |       |
| 0-20    | 0,97                            | 17    | 58    | 9,8      | 29    |
| 20-40   | 0,88                            | 15    | 52    | 6,8      | 26    |

Fonte: Laboratório do Departamento de Recursos Naturais – Setor Ciência do Solo. UNESP-Botucatu.

Com base nos resultados da Tabela 3, não houve a necessidade de realizar a calagem na área, tampouco adubação de plantio com fertilizantes. Aplicaram-se apenas 2 kg por m<sup>2</sup> do composto orgânico minho fértil<sup>®</sup> (produto que apresenta a composição de nitrogênio: 1,0%; pH: 6,0; Carbono Orgânico: 15; Relação (C/N): 18/1; relação CTC/C: 20 Umidade (máx): 50% e 200 gramas por m<sup>2</sup> de torta de mamona.

O preparo do solo consistiu no seu revolvimento do mesmo com auxílio da enxada rotativa. Posteriormente, foi adicionado composto orgânicos e torta de mamona, incorporados novamente com a enxada rotativa e, por fim, foram confeccionadas leiras de 0,7 m de largura, e 0,3 m de altura no sentido longitudinal do ambiente protegido, distanciadas 1,0 m entre elas, com total de três leiras de cultivo.

### 5.3.3 Delineamento experimental e tratamentos

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com tratamentos delineados em parcela subdividida, adotando-se nas unidades experimentais quatro tratamentos, de plantas enxertadas („Muralha“ + „Forty“; „Guardião“ + „Forty“; „Woodstock“ + „Forty“) e o pé-franco „Forty“, e nas subparcelas, oito épocas de avaliações [10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 dias após o transplante (DAT)], com seis repetições.

Para a produção do tomateiro, o delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com quatro tratamentos e seis repetições.

### 5.3.4 Relação de cultivares de enxerto e porta-enxerto de tomateiro

As informações foram obtidas dos catálogos das respectivas empresas com relação à resistência a doenças dos híbridos utilizados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Descrição de híbridos porta-enxertos „Muralha“, „Guardião“ e „Woodstock“ e enxerto „Forty“ utilizados no experimento. Salto - SP, 2014.

| <b>Porta-enxerto</b> | <b>Empresa</b> | <b>**Resistências</b>                              |
|----------------------|----------------|--|
| Muralha              | Takii          | Rs, V, Fol, Ma, Mi, Mj, ToMV                       |
| Guardião             | Takii          | Rs, V (1 e 2), Fol (1 e 2), Forl, ToMV, Ma, Mj, Mi |
| Woodstock            | Sakata         | *Rs, V, Fol (1 e 2), Mi e Mj (1, 2, 3 e 4), ToMV   |
| <b>Enxerto</b>       |                |  |
| Forty                | Syngenta       | V, Forl (1 e 2), TMV, ToYVSV                       |

\*\*Resistente \* Moderadamente resistente: Rs: Murcha-bacteriana (Rs); V: Murcha de verticílio (V); Murcha de fusário (Fol); Podridão da coroa e da raiz (Forl); Vírus do mosaico do tomateiro ( ToMV); Ma: (*Meloidogyne arenaria*); Mi: (*Meloidogyne incognita*); Mj: (*Meloidogyne javanica*); TMV: vírus do mosaico do tabaco (*Tobacco mosaic virus*); ToYVSV: Geminivírus (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*).

### 5.3.5 Produção das mudas

As mudas foram produzidas na Empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda., no município de Bragança Paulista-SP, entre os meses de março e abril de 2014. A

enxertia e os cuidados pós-enxertia são os mesmos já mencionados no item 5.1.4 (experimento I).

### 5.3.6 Condução do experimento

O transplante das mudas (Figura 17) ocorreu no dia 24-04-2014, momento em que já apresentavam boa cicatrização no local da enxertia. As mudas foram transplantadas em fileira dupla, com espaçamento de 0,7 x 0,5 m, e cada unidade experimental apresentou uma área de 3,4 m<sup>2</sup>, composta de 12 plantas, seis plantas em cada linha. As oito plantas centrais, ou seja, as quatro centrais de cada linha foram destinadas para a avaliação da incidência da murcha bacteriana e da produção dos frutos, e as demais, consideradas bordadura.



**Figura 17.** Vista geral do interior do ambiente protegido, após o transplante das mudas, no município de Salto - SP.

Utilizou-se do sistema de irrigação via gotejamento, sendo utilizada em linha dupla no canteiro. O tutoramento das plantas foi realizado com fitilhos, sendo conduzidas com uma haste. As desbrotas foram realizadas semanalmente. Foram realizadas cinco adubações de cobertura, duas com o adubo 4-14-08 (20 g /planta) e três com 12-00-12 (20 g/planta).

O tratamento fitossanitário foi feito de acordo com a necessidade da cultura. Dentre as pragas que ocorreram durante o ciclo da cultura foram: mosca-branca, trips e broca das quais são consideradas de difícil controle.

Com relação às doenças, identificou-se a virose *Tomato chlorosis virus* (ToCV), do gênero Crinivírus, transmitido por moscas-brancas sendo confirmado pela análise de RT-PCR (Laboratório Virologia- UNESP-FCA).

O ciclo do cultivo do tomateiro foi de 126 dias do transplante até a última colheita. Foram realizadas seis colheitas no total (Figura 18).



Foto: Ewerton G da Silva

**Figura 18.** Vista geral do início da colheita dos frutos do tomateiro.

### **5.3.7 Avaliação da produção e classificação dos frutos**

As características de produção avaliadas foram: produtividade comercial em  $\text{kg m}^{-2}$  e classificação dos frutos em classe (diâmetro-mm), de acordo com o programa brasileiro para a modernização da horticultura (CEAGESP, 2003).

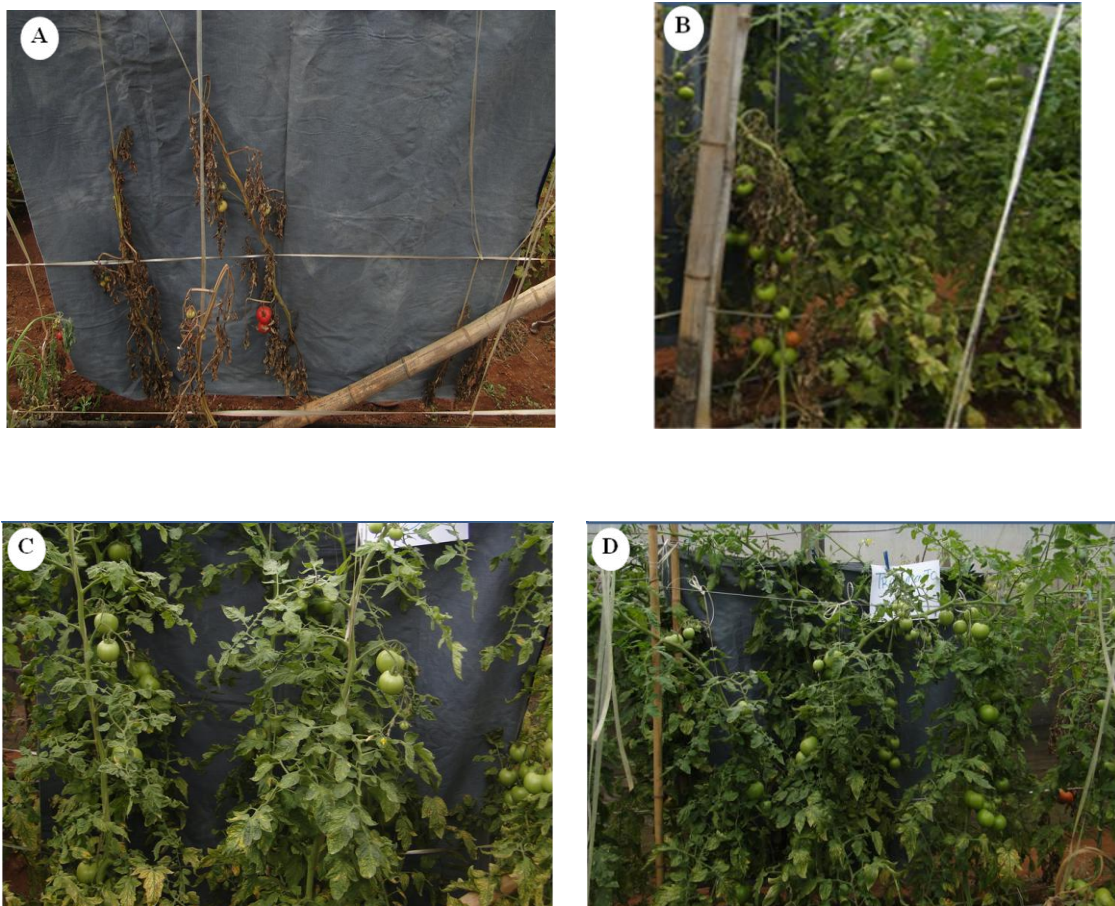
### **5.3.8 Avaliação da incidência da murcha bacteriana (% de folhas murchas)**

Foram realizadas oito avaliações da doença, dos dez aos noventa dias após o transplante, com intervalo de dez dias entre uma avaliação e outra. O cálculo da

incidência da doença foi conforme fórmula descrita a seguir (SILVA; PASCHOLATI; BEBENDO, 2007).

$$\text{Folhas murchas (\%)} = \frac{\text{Número de folhas murchas} \times 100}{\text{Número total de folhas da planta}}$$

A Figura 19 mostra os tratamentos realizados 100 dias após o transplante com relação à incidência da MB no ambiente protegido.



**Figura 19.** Incidência da murcha bacteriana nos tratamentos, aos 100 dias após o transplante. (A) pé-franco „Forty“, (B) planta enxertada „Woodstock“+ „Forty“, (C) planta enxertada „Muralha“ + „Forty“ e (D) planta enxertada „Guardião“ + „Forty“.

### 5.3. 9 Análise estatística

Realizou-se o teste de Levene, indicando que houve necessidade de transformação dos dados ( $\sqrt{(x + 0,5)^{0,5}}$ ) somente para os dados da incidência da murcha bacteriana.

Efetou-se a análise de variância (teste F) para os tratamentos, e quando significativo, realizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para a comparação das médias. As avaliações no tempo para trocas gasosas e incidência da murcha bacteriana (%) foram avaliadas mediante análise de regressão. Os dados foram analisados com auxílio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 1998).

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Experimento I: Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) em plantas de tomateiro inoculadas com *R. solanacearum* e plantas sem inoculação**

#### **6.1.1 Atividade enzimática da SOD e CAT nas folhas do tomateiro**

A atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), nos tratamentos inoculados com *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), encontram-se nas Figuras 20 A e 20 C, enquanto para os tratamentos não inoculados estão apresentados nas Figuras 20 B e 20 D.

O pé-franco „Pizzadoro“ inoculado (PFi) apresentou diferença significativa da SOD para plantas enxertadas „Muralha“ + „Pizzadoro“ inoculado (PEi) as 12, 48 e 144 horas após a inoculação (HAI), sendo que as 48 e 144 foram as coletas que apresentaram maior atividade enzimática desse tratamento. Já o PEi foi significativamente superior as 72, 96, 120 e 288 HAI, sendo constatado o pico enzimático as 72 HAI (Figura 20 A).

O pé-franco „Pizzadoro“ não inoculado (PFni) apresentou aumentos significativos nas duas primeiras épocas (Figura 20 B), em relação as plantas enxertadas „Muralha“ + „Pizzadoro“ não inoculadas (PEni). Aumentos na atividade enzimática nas

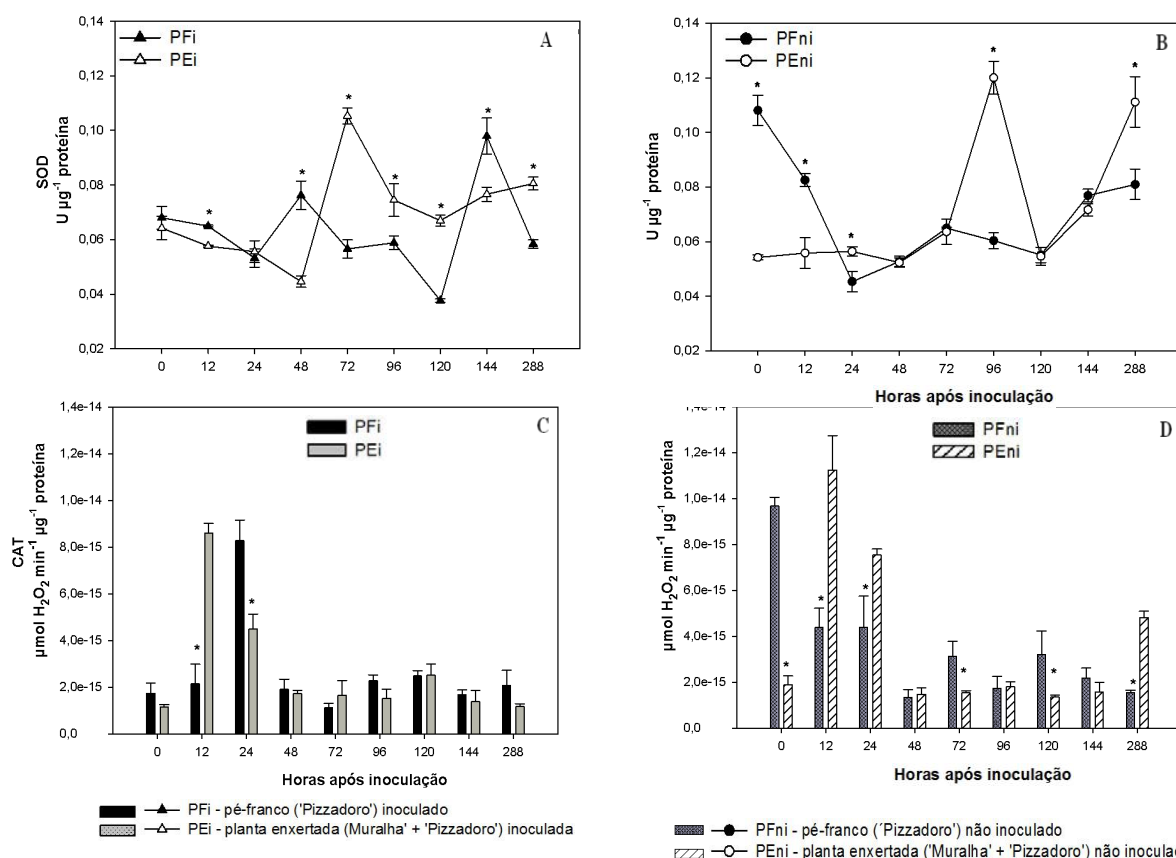
épocas 96 e 288 HAI foram observados nas plantas enxertadas não inoculadas diferindo do PFni, expressando nessas coletas as maiores atividades desse tratamentos . Esse resultado reforça a hipótese de que, nas plantas inoculadas, o aumento da SOD foi provocado possivelmente pelo patógeno, enquanto que o pico da atividade observado às 96 horas após a inoculação com água destilada estéril (HAIA) pode ter sido uma resposta tardia da inoculação com água, o que promoveu um ferimento, ou relacionado com processo de cicatrização do processo da enxertia. Provavelmente, esses aumentos nas plantas inoculadas sejam uma resposta à maior sensibilidade em comparação às não inoculadas, em função de uma possível eliminação de radicais livres a qual esteja sendo formada em resposta ao estresse oxidativo, gerado pelo patógeno.

Ao observarmos os resultados obtidos para plantas inoculadas com as não inoculadas (controle), nota-se que as que receberam o inóculo apresentam maior atividade da SOD. Provavelmente, esse aumento ocorreria para minimizar o efeito de estresse nas plantas, a SOD catalisa a dismutação de um radical  $O_2^{\circ}$  em  $H_2O_2$ , e este pode ser tóxico ao patógeno (RESENDE et al., 2003), constituindo-se a primeira linha de defesa celular das plantas. Dessa forma, plantas enxertadas apresentaram maior atividade da SOD, mostrando um possível mecanismo antioxidante mais forte em comparação com as não enxertadas. Sabe-se que deve existir um equilíbrio entre os níveis de radicais livres formados, o que fornece à planta a resistência. Segundo Mandal e Mishra (2011), a concentração de radicais livres em tecidos de plantas é o resultado de um equilíbrio dinâmico entre a produção e sua eliminação. Esses autores detectaram maior atividade da SOD em plantas de tomateiro inoculadas com *Rs* às 72 HAI, resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo.

A maior atividade da CAT do tratamento PEi ocorreu 12 HAI (Figura 20 C), diferindo do PFi. Já o PFi apresentou maior atividade as 24 HAI, diferindo do PEi. Para as plantas não inoculadas, porém enxertadas (Figura 20 D), a maior atividade da CAT também ocorre às 12 e 24 HAI, o que poderia confirmar, nesse caso, o efeito de outro estresse nas plantas, provavelmente devido ao processo da cicatrização dos ferimentos realizados durante a enxertia, que não fosse o provocado pelo patógeno, visto que em ambos os tratamentos PEi e PEni pico enzimático ocorreu com 12 HAI. Esse estresse gerou uma resposta enzimática contra as EROS formadas. É importante que um organismo contenha níveis de EROS em equilíbrio. Quando esse equilíbrio é afetado, espécies antioxidantes são formadas, como as enzimas antioxidantes (NASCIMENTO;

BARIGOSSI, 2014). É descrito na literatura que as plantas com níveis mais elevados de antioxidantes apresentam maior resistência aos danos oxidativo (FIKRET et al., 2013).

O PFni apresentou alta atividade de CAT, assim como na SOD, logo após o processo de manipulação (procedimento da inoculação das plantas). Provavelmente, a manipulação ou outro efeito abiótico, pode ter promovido um estresse, gerando uma resposta enzimática contra os radicais livres formados, como radicais hidroxila, peróxidos, oxigênio singlete, entre outros. As catalases funcionam como canal de limpeza do  $H_2O_2$  celular (BREUSEGEM et al., 2001), oriundo da reação da SOD. Em plantas de tomateiro inoculadas com *Botrytis cinerea*, Kuznizk e Sklodowska (2005) observaram maior atividade da CAT nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. Essa diferença não foi encontrada no presente estudo em folhas.



**Figura 20.** Atividade enzimática da SOD ( $U \mu g^{-1}$  de proteína) e CAT ( $\mu mol H_2O_2 min^{-1} \mu g^{-1}$  de proteína) nas folhas do tomateiro. As barras de erro representam o intervalo de confiança das médias. \* indica diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey, entre os tratamentos. As figuras do lado esquerdo (A e C) representam os tratamentos inoculados com *Rs*, e as do lado direito (B e D), os tratamentos não inoculados. (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

### 6.1.2 Atividade enzimática da POD, PPO e PAL nas folhas do tomateiro

A atividade da peroxidase (POD) entre os tratamentos inoculados encontra-se na Figuras 21 A. O PFi apresentou aumentos da atividade da POD às 48, 96 e 288 HAI, enquanto o PEi, os aumentos ocorreu inicialmente na primeira coleta e posteriormente as 72 e 288 HAI. Nas plantas não inoculadas, PFni apresentou “picos” da atividade na primeira e as 120 horas após inoculação com água destilada estéril (HAIA). A maior atividade da PEni ocorreu às 24, 48, 72, 96 e 288 HAIA, diferindo do PFni (Figura 21 B).

A peroxidase, nas folhas do tomateiro, possivelmente tenha respondido ao ataque do patógeno, pois a enzima apresentou alterações que possivelmente diferenciem o nível de estresse, como identificado para a SOD. A maior atividade da POD verificada nas folhas foi semelhante às observadas para a atividade da SOD, mostrando a sequencia de eliminação do excesso de possíveis EROS. A peroxidase elimina radicais peróxidos, semelhante à catalase, utilizando os compostos fenólicos como substrato através da reação com  $H_2O_2$  (YOSHIDA et al., 2003).

Com relação à polifenoloxidase (PPO), o PFi diferiu estatisticamente do PEi com maior atividade às 12, 48 e 288 HAI, enquanto que o PEi, apresentou diferenças inicialmente e posteriormente às 72 e 120 HAI para o PFi (Figura 21 C). O pico enzimático, em ambos os tratamentos, foi observado na última coleta (288 HAI).

Nos tratamentos não inoculados (Figura 21 D), o PFni apresentou diferença para PEni somente na primeira coleta. Já o PEni as diferenças significativas para PFni ocorreu às 24, 48, 96, 144 e 288 HAIA em relação ao PFni. A atividade de ambas as enzimas pode estar correlacionada com o processo de cicatrização causado pelo estresse mecânico da enxertia.

PFi mostrou maior valor da fenilalanina amônia liase (PAL) na primeira avaliação e posteriormente às 12 e 48 HAI. Por outro lado, PEi apresentou aumento na atividade com 72 e 120 HAI, o que pode ser um indicativo de resistência da planta (Figura 21 E). No sistema de defesa de plantas, principalmente as enxertadas, existem certas enzimas que apresentam aumento da atividade como um mecanismo de defesa contra estresse biótico ou abiótico (IRISARRI et al., 2015). A atividade da PAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no

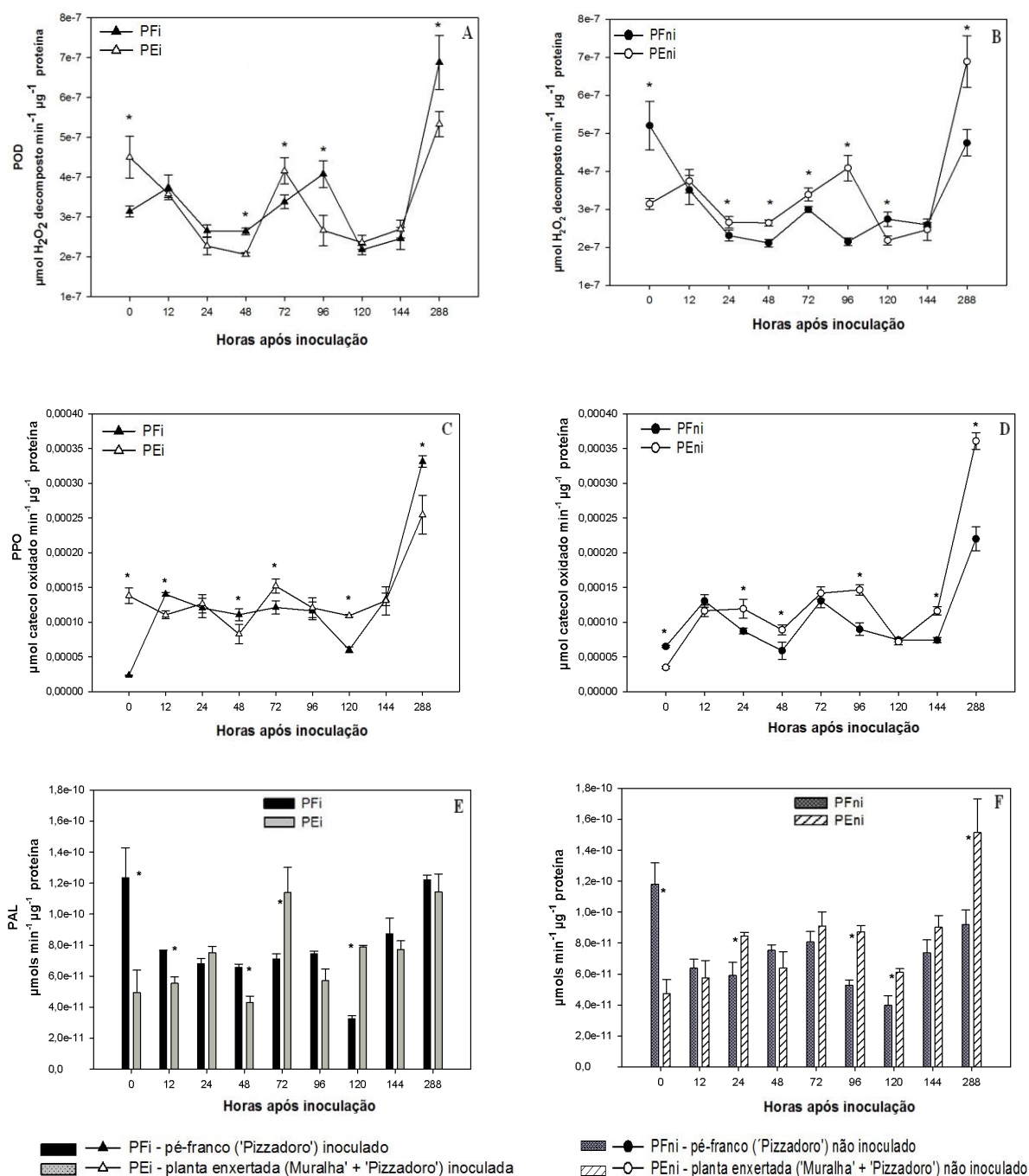
primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido transcinâmico, catalisada pela PAL, resultando em compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (GHAN; ZAO, 2012; NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

Para os tratamentos não inoculados o PFni diferiu estatisticamente somente na primeira coleta para o PEni. Porém o PEni diferiu do PFni às 24, 96, 120 e 288 HAI.

Quando se comparam as plantas pé-franco e enxertadas não inoculadas, as enxertadas apresentam maior atividade enzimática (Figura 21 F). Essa maior atividade enzimática pode ser fator importante para sobrevivência, principalmente em relação aos patógenos. A atividade da PAL em pimenta enxertada foi maior em comparação com o pé-franco, tanto antes como após a inoculação com *Fusarium solani* (JIANG et al., 2010).

Outros estudos demonstram que plantas enxertadas e inoculadas com patógeno apresentam maior atividade de PAL maior. Kavitha e Umesha (2008) relataram a participação da PAL nos mecanismos de resistência em tomateiro, observaram aumento da atividade após a inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis* e constataram que a enzima atingiu máxima atividade às 21 HAI nos genótipos resistentes. Neste trabalho, a máxima atividade ocorreu com 72 HAI.

De acordo com Mandal e Mishra (2011), as plantas de tomateiro com resistência podem apresentar sistema antioxidante mais eficiente, menor taxa de peroxidação lipídica e maior deposição de lignina na parede celular, as quais podem contribuir no aumento da resistência contra patógeno. Em nosso estudo, as plantas enxertadas e inoculadas apresentaram maior atividade em relação ao pé franco, demonstrando que, possivelmente, houve maior eficiência do sistema antioxidante analisado. A resistência proporcionada pela enxertia está relacionada à melhoria da atividade de enzimas antioxidantes (HE et al., 2009).



**Figura 21.** Atividade enzimática da POD ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), PPO ( $\mu\text{mol catecol oxidado min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) e PAL ( $\mu\text{mols min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) nas folhas do tomateiro. As barras de erro representam o intervalo de confiança das médias. \* indica diferença significativa a 5 % de probabilidade, pelo teste Tukey, entre os tratamentos. As figuras do lado esquerdo (A, C, E) representam tratamentos inoculados com *Rs*, e do lado direito (B, D, F) tratamentos não inoculados. (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

### 6.1.3 Atividade enzimática da SOD no caule do tomateiro (região da enxertia)

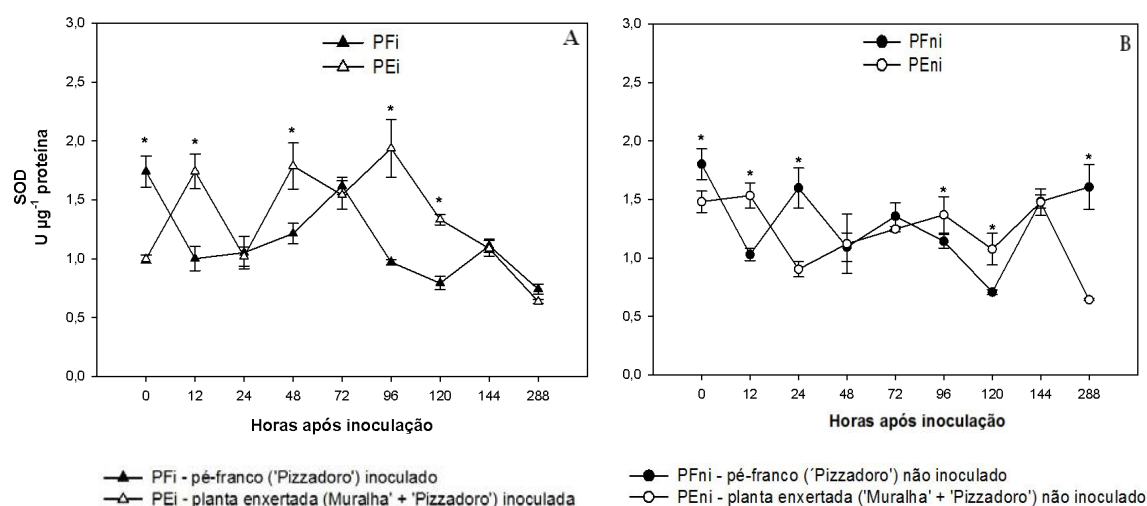
Nas análises bioquímicas, realizadas a partir da região da enxertia no caule do tomateiro, verificou-se que a atividade da SOD no tratamento PEi foi significativamente maior às 12, 48, 96 e 120 HAI em relação ao PFi. No PFi ocorreu diferença para PEi somente na primeira coleta (Figura 22 A).

Nos tratamentos não inoculados (Figura 22 B), o PFni apresentou maior atividade da SOD em relação ao PEni nas épocas 0, 24 e 288 HAI. Já PEni diferiu estatisticamente do PFni nas épocas 12, 96 e 120 horas após inoculação com água destilada estéril (HAIA).

Analisando os resultados obtidos de plantas inoculadas e não inoculadas (Figuras 22 A e 22 B), nota-se que há respostas diferentes à atividade da enzima. O PEi apresentou valores mais elevados em média, em relação ao PFi. Este efeito pode ter ocorrido devido ao processo de infecção do patógeno ter induzido formação de EROS, ativando assim o sistema antioxidativo das plantas, ou seja, a SOD apresentou alterações que diferenciaram o nível de estresse nas plantas inoculadas.

As EROS podem acumular-se rapidamente no início do processo infeccioso, caracterizando uma reação oxidativa, tendendo ao desequilíbrio das moléculas oxidantes. As enzimas antioxidantes irão atuar, eliminando esses radicais livres que são formados em excesso, principalmente, em resposta aos patógenos (NASCIMENTO; BARIGOSSI, 2014). Maior atividade da SOD devido a infecção do fungo *Mycosphaerella fragaria* em morangueiro foi descrita por Ehsani-Moghaddam et al. (2006), que constataram maior atividade nos materiais resistentes, o que levanta a hipótese de uma possível estratégia da planta em restringir o desenvolvimento do fungo pela ação desta enzima antioxidante.

Não foi possível quantificar a CAT no caule, pois a mesma não mostrou atividade enzimática nesse local.



**Figura 22.** Atividade da SOD (U µg<sup>-1</sup> de proteína) no caule (região da enxertia) do tomateiro. As barras de erro representam o intervalo de confiança das médias. \* indica diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey, entre os tratamentos. A figura do lado esquerdo (A) representam tratamentos inoculados com *Rs*, e do lado direito (B), tratamentos não inoculados. (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

#### 6.1.4 Atividade enzimática da POD, PPO e PAL no caule do tomateiro (região da enxertia)

O PFi expressou uma atividade inicial alta da POD diferindo do PEi, sendo nesta coleta onde tratamento expressou sua maior atividade.

No tratamento PEi foi superior ao PFi às 12, 72, 96, 120 e 144 HAI, sendo constatado as 12 HAI o pico enzimático desse tratamento (Figura 23 A).

Nos tratamentos não inoculados, o PFni apresentou um “pico” enzimático com 24 horas após a coleta, diferindo estatisticamente do PEni. Analisando o PEni, expressou diferenças nas coletas 12, 72, 96, 120 e 144 HAIA, com maior atividade em comparação ao PFni (Figura 24).

Alguns estudos demonstram que logo após a inoculação, pode ocorrer aumento da atividade da POD. Em tomateiro, Jiang et al. (2013) descreve aumento da atividade da enzima após 24 horas da inoculação com *Rs*. Entretanto, esse resultado não foi observado neste estudo, onde encontramos aumento após 12 horas. Por outro lado, as plantas podem ter um mecanismo diferenciado de resistência, pois mostraram aumento da atividade da enzima após 12 horas, mostrando uma resposta precoce. Provavelmente, esse desempenho possa ser atribuído às diferenças dos híbridos estudados, com características de resistência inerente a cada genótipo, inseridas através do melhoramento vegetal.

Plântulas de colza após a inoculação de esporos do fungo *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*) mostraram aumento da atividade da POD 72 horas após a inoculação. Possivelmente, o sistema de defesa da planta foi ativado em função da produção  $H_2O_2$  formado pelo ataque do patógeno (HURA et al., 2013). As peroxidases são importantes nos processos de lignificação, deposição de suberina e oxidação de compostos fenólicos, podendo ter sua atividade alterada pelo ataque de patógenos (PASCHOLATI et al., 2008), além de ser um antioxidante importante nas células das plantas envolvidas na desintoxicação de EROs (MITTLER et al., 2004).

Na atividade da PPO, o PFi mostrou diferença para PEi somente na primeira coleta. Posteriormente, ocorreu um aumento com 24 HAI, e nas demais coletas, houve redução na atividade. O PEi mostrou-se superior às 12, 48, 72, 96, 120 e 144 HAI em comparação ao PFi, com “pico” máximo da atividade as 96 HAI (Figura 23 C). Provavelmente, essa maior atividade observada no PEi possa ser atribuída a uma possível resistência da planta. Por outro lado, essa resposta não difere dos tratamentos não inoculados (Figura 23 D). Nestas plantas, entretanto, houve o processo da enxertia, que é um processo, que induz estresse.

Maior atividade da PPO em tecidos infectados de plantas resistentes também foram verificadas por Orober et al. (1999) e Agrios (2005) que constataram maior atividade da PPO nos tecidos infectados das cultivares resistentes do que em tecidos infectados de cultivares suscetíveis. Quanto maior a atividade da enzima PPO, maiores concentrações de produtos tóxicos da oxidação, como por exemplo, quinonas, os quais conferem resistência às infecções (AGRIOS, 2005).

Os tratamentos não inoculados PFni e PEni estão apresentados na figura 23 D. O PFni apresentou diferenças significativas para o PEni na coleta inicial e posteriormente as 24 e 288 HAIA. Entretanto, o PEni diferiu as 12, 48, 72, 96 e 120 HAIA em relação ao PFni.

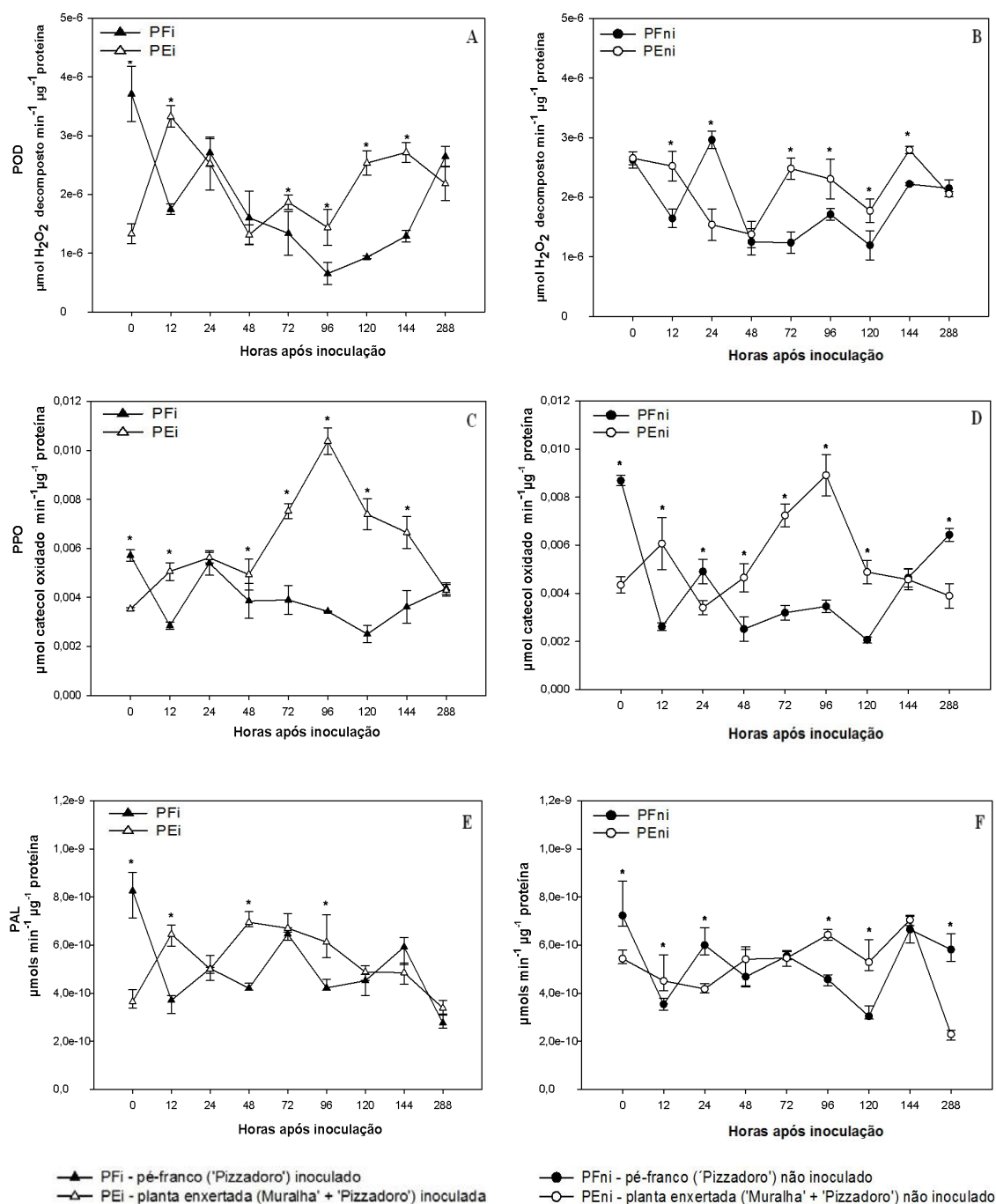
Apesar do aumento ocorrido nas plantas enxertadas inoculadas, os tratamentos sem inoculação do patógeno mostraram tendência de comportamento semelhante. A atividade da PPO no local da enxertia parece não ter respondido ao ataque do patógeno, ou seja, a enzima não apresentou alterações que diferenciem o nível de estresse, como identificado para outras enzimas, como a SOD e POD no local da enxertia. Portanto, o resultado da maior atividade pode ser atribuído ao efeito da enxertia.

Nos resultados obtidos para PAL, o PFi, mostrou valor inicial alto da atividade, diferindo do PEi. A atividade dessa enzima no PEi mostrou-se superioridade às plantas PFi as 12, 48 e 96 HAI (Figura 23 E).

Nos tratamentos não inoculados (Figura 23 F), o PFni mostrou-se superior ao PEni na avaliação inicial (momento da inoculação) e depois às 24 e 288 HAI, coincidindo com as maiores atividades constatadas nesse tratamento. O tratamento enxertado diferiu estatisticamente do pé-franco às 12, 96, 120 e 288 HAI. Entretanto, os aumentos mais acentuados da PAL ocorreram as 96 e 144 HAI, quando expressaram as maiores atividades enzimáticas.

A atividade da PAL, no PEi, foi a mais alta em relação ao PFi. Isso pode estar relacionado com a resposta dessas plantas ao patógeno, fazendo com que aumente capacidade catalisadora para a formação de fenóis. O acúmulo destes compostos nas plantas é essencial para sua defesa, podendo ser tóxicos aos patógenos, além de agirem como antioxidantes (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

Vanitha et al. (2009) estudando mais de 20 cultivares de tomate, verificaram que genótipos resistentes a *Rs* apresentaram maior atividade das enzimas PAL e PPO em comparação com as plantas suscetíveis, bem como maior acúmulo de compostos fenólicos. Esse aumento de fenólicos deve ser em função da atividade da PAL. Em plantas de tomateiro, quando infectadas por *Rs*, ocorreram alterações nas atividades das enzimas POD, PPO e PAL (SILVA; PASCHOLATI; BEBENDO, 2007).



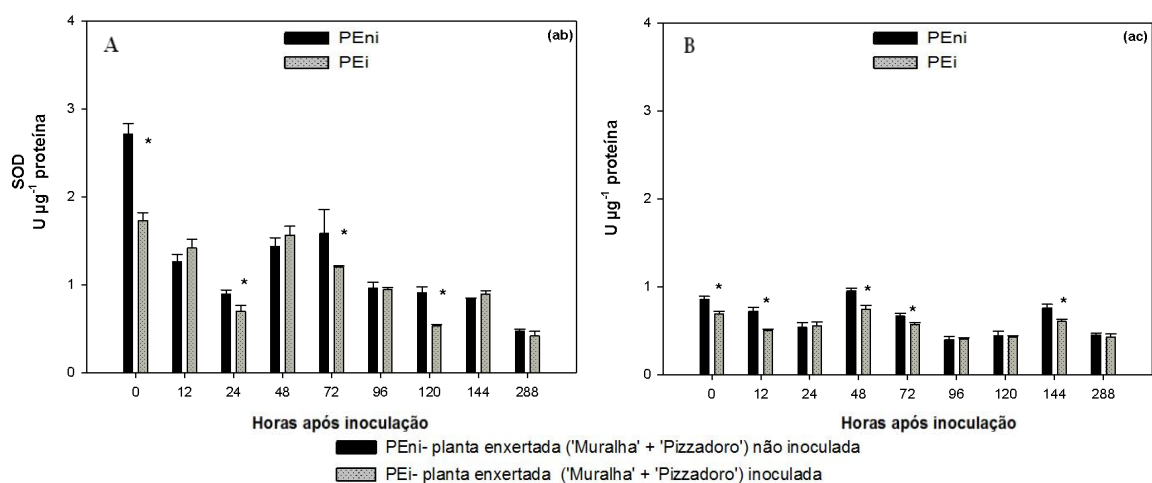
**Figura 23.** Atividade enzimática da POD ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), PPO ( $\mu\text{mol catecol oxidado} \text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) e PAL ( $\mu\text{mols} \text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) no caule (região da enxertia) do tomateiro. As barras de erro representam o intervalo de confiança das médias. \* indica diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey, entre os tratamentos. As figuras do lado esquerdo (A, C, E) representam tratamentos inoculados com *Rs*, e do lado direito (B, D, F) tratamentos não inoculados. (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

### 6.1.5 Atividade da SOD no caule do tomateiro (Abaixo e acima do ponto de enxertia)

A atividade da SOD abaixo do ponto de enxertia (Figura 24 A) foi superior ao encontrado acima da enxertia (Figura 24 B). A dinâmica da enzima frente aos tratamentos PEni e PEi apresentou diferença ao longo do tempo. A atividade abaixo do ponto de enxertia do PEni mostrou-se diferente ao PEi inicialmente e posteriormente as 24, 72 e 120 HAI.

Para a atividade acima do ponto de enxertia, o PEni apresentou superioridade estatística para o PEi na primeira coleta e depois as 12, 48, 72 e 144 HAI (Figura 24 B)

Os dados mostram que a atividade da SOD do porta-enxerto, isto é, análise da abaixo da enxertia, foi maior em relação ao enxerto, o que se deve provavelmente à resistência do genótipo utilizado. Geralmente, são usados genótipos resistentes como porta-enxerto. Esses responderiam ao ataque de patógenos, ou outro tipo de estresse, ativando o seu sistema antioxidante, seja enzimático ou não enzimático, em função ao nível desbalanceado das espécies reativas de oxigênio geradas pelo estresse, o que aumentaria a produção de EROS (MANDAL; MISHRA, 2011), Isto resultaria num dano celular, manifestado pelo aumento da atividade de certas enzimas, como observado neste estudo, através da SOD, a primeira enzima da linha de defesa de plantas, catalisando a dismutação do superóxido  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (SCANDALIOS, 2005), representando, assim, um dos principais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo celular.



**Figura 24.** Atividade da SOD ( $U \mu g^{-1}$  de proteína) no caule do tomateiro (abaixo e acima do ponto de enxertia). As barras de erro representam o intervalo de confiança das médias. \* indica diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey, entre os tratamentos. A figura do lado esquerdo (A) representam tratamentos abaixo da enxertia (ab) e a do lado direito (B) representam os tratamentos acima da enxertia (ac). (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

### 6.1.5 Atividade da POD, PPO e PAL no caule do tomateiro (Abaixo e acima do ponto enxertia)

O valor da atividade da POD abaixo do ponto de enxertia encontra-se na figura 25 A. O tratamento PEi, abaixo do ponto de enxertia mostrou diferença na atividade as 12 e 48 HAI em relação ao PEni, enquanto o PEni expressou diferenças de atividade inicialmente e posteriormente 72 e 96 horas após inoculação. Nas demais avaliações, a atividade da enzima foi semelhante entre os tratamentos, não apresentando diferenças significativas entre si.

Nas análises acima da enxertia, os tratamentos PEi e PEni foram similares ao longo do tempo, sendo as diferenças entre os tratamentos ocorreram na primeira coleta e as 48 e 72 HAI (Figura 25 B).

A maior atividade da POD foi ab, semelhantemente ao observado para a atividade da SOD, mostrando a sequencia de eliminação do excesso de possíveis EROS. A peroxidase elimina radicais peróxidos, semelhante à catalase, utilizando os compostos fenólicos como substrato através da reação com  $H_2O_2$  (YOSHIDA et al., 2003). A enzima atua no processo de lignificação, cicatrização de ferimentos e defesa de patógenos (HIRAGA et al., 2001).

Tem sido demonstrado que a atividade da enzima pode ser induzida por fungos, bactérias e vírus (BABU et al., 2008; HIRAGA et al., 2000). Trabalhos na literatura relacionaram o aumento na atividade da POD x doença. Em plantas de pimenteiro, foi observado alteração da atividade de POD após as plantas serem infectadas com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. (DO et al., 2003). Maior conteúdo de compostos fenólicos, menor taxa de peroxidação lipídica e maior deposição de lignina na parede celular, foram encontradas nas plantas de tomateiro com resistência a *Rs*, quando comparadas com às suscetíveis inoculadas, contribuindo para maior resistência das plantas contra o patógeno (MANDAL; MISHRA, 2011).

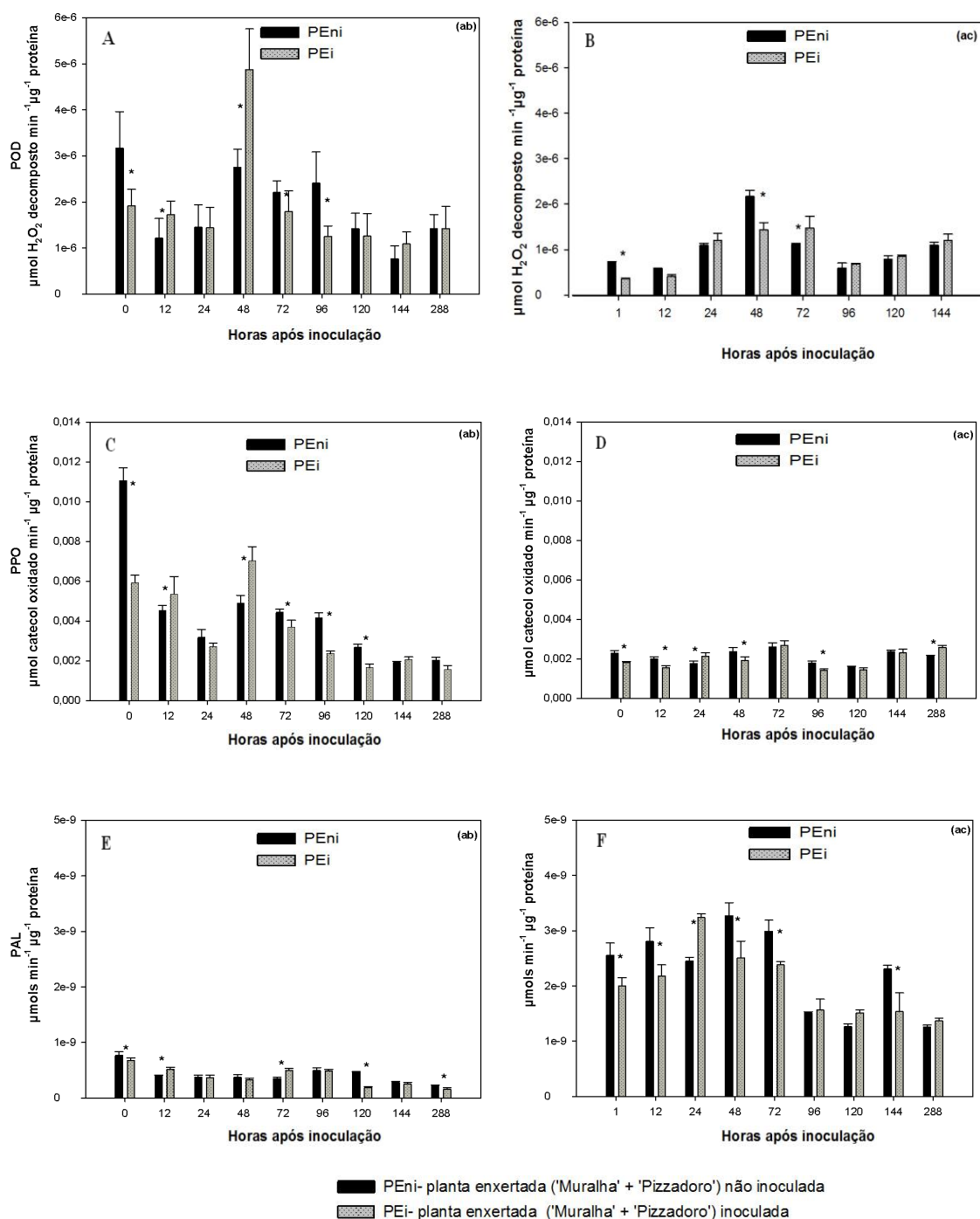
Os valores da PPO abaixo do ponto de enxertia encontram-se na figura 25 C. As diferenças entre os tratamentos ocorreram na primeira coleta e as 12, 48, 72, 96 e 120 HAI, nas demais coletas não houve diferença entre os tratamentos. Para o PEi atividade enzima ocorreu com 48 HAI, o mesmo comportamento apresentado na SOD e POD. Na avaliação acima do ponto de enxertia as diferenças entre os tratamentos ocorreram inicialmente e posteriormente as 12, 24, 48, 96 e 288 HAI, nas demais coletas não houve diferença entre os tratamentos.

Observou-se que a quantificação da PPO acima do ponto de enxertia (Figura 25 D) foi menor em relação ao encontrado abaixo da enxertia. O fato de a maior atividade da PPO ter ocorrido no porta-enxerto entre abaixo e local da enxertia, pode ser devido à oxidação de compostos fenólicos, catalisada pela PPO (THIPYAPONG; STOUT; ATTAJARUSIT, 2007), em função da característica de resistência a *Rs* apresentada pelo porta-enxerto.

Os resultados deste estudo com plantas enxertadas e pé-franco infectadas com *Rs*, sugere uma possível relação da PPO com a defesa do tomateiro a esta bactéria, assim como os encontrados por Chen et al. (2003) e Vanitha et al. (2009), que relacionaram o aumento na atividade da PPO com as alterações do metabolismo.

Os valores da atividade enzimática da PAL abaixo do ponto de enxertia (Figura 25 E) foram menores aos observados acima do ponto de enxertia (Figura 25 F). Ambos os tratamentos ( PEni e PEi ) na região abaixo apresentaram diferenças entre si nas avaliações 0, 12, 72, 120 e 288 horas após inoculação, entretanto nas demais, não houve diferença significativa. Para as avaliações acima diferenças foram constatadas na primeira coleta (tempo zero) e posteriormente as 12, 24, 48 72 e 144 entre os tratamentos. Diferentes partes das plantas, que passaram por injúria, podem responder de maneiras diferenciadas a uma dada lesão (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

A menor atividade da PAL observada abaixo mostra que esta enzima pode não ter sido indicador de estresse nesse local. Por outro lado, uma hipótese seria que o enxerto, devido a sua característica ser suscetível, necessitaria de maior conteúdo de substâncias, como (poli)fenóis, que atuariam como moléculas antioxidantes, isto é, eliminariam o excesso de radicais livres formados, seja a partir de estresse (biótico ou abiótico), ou simplesmente, por estarem em fase de crescimento e/ou por ficarem expostas frequentemente as condições ambientais.



**Figura 25.** Atividade enzimática da POD ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), PPO ( $\mu\text{mol catecol oxidado min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) e PAL ( $\mu\text{mols min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), no caule do tomateiro (abaixo e acima do ponto de enxertia). As barras de erro representam o intervalo de confiança das médias. \* indica diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey, entre os tratamentos. As figuras do lado esquerdo (A, C, E) representam tratamentos abaixo da enxertia (ab), e as do lado direito (B, D, F) representam os tratamentos acima da enxertia (ac). (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

## 6.2 EXPERIMENTO II: Avaliação da incidência da murcha bacteriana do tomateiro e trocas gasosas em plantas enxertadas e pé-franco de tomateiro, inoculadas com *R. solanacearum*

### 6.2.1 Incidência da murcha bacteriana

Aos cinco dias após a inoculação (DAI), observou-se início da manifestação dos sintomas da murcha bacteriana (MB) na testemunha suscetível pé-franco – „Pizzadoro“ (PFP). A evolução da doença ocorreu de forma rápida nesse tratamento, apresentando morte de todas as plantas com 20 DAI (Tabela 5).

Os tratamentos enxertados (PEMP e PEWP) referem-se às combinações porta-enxerto/enxerto („Muralha“ + „Pizzadoro“) e („Woodstock“ + „Pizzadoro“). Não houve diferença entre os tratamentos enxertados, mas ambos, a partir dos 10 DAI até ao final das avaliações, diferiram do PFP, apresentando menor porcentagem (%) da doença (Tabela 5).

No final do experimento, o PEMP e PEWP apresentaram 27 e 25 %, respectivamente, de sintomas, mesmo apresentando resistência à doença.

**Tabela 5.** Incidência de folhas murcha de tomateiro(%) pé-franco e enxertado inoculado com *Ralstonia solanacearum* em casa de vegetação. (UNESP-FCA, Botucatu- 2013).

| Trat           | Dias após inoculação |     |       |       |        | Equação da regressão                   | R <sup>2</sup> |
|----------------|----------------------|-----|-------|-------|--------|--|----------------|
|                | 0                    | 5   | 10    | 15    | 20     |  |                |
| PFP            | 0 B                  | 6 B | 77 aA | 97 aA | 100 aA | -0,18 x <sup>2</sup> + 9,37 x - 8,12** | 0,93           |
| PEMP           | 0 B                  | 0 B | 0 bB  | 4 bB  | 27 bA  | 1,15 x - 5,38 **                       | 0,60           |
| PEWP           | 0 B                  | 0 B | 0 bB  | 4 bB  | 25 bA  | 1,07 x - 5 **                          | 0,60           |
| F 24,70 *      |                      |     |       |       |        |  |                |
| CV 1 (%) 54,88 |                      |     |       |       |        |  |                |
| CV 2 (%) 55,87 |                      |     |       |       |        |  |                |

Letra minúscula compara os tratamentos na coluna, e letra maiúscula compara tratamentos na linha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo. \* e \*\* são significativo a 5 e 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente. Cv (%): coeficiente de variação. Trat: tratamentos. PFP: pé-franco „Pizzadoro“; PEMP: planta enxertada („Muralha“ + „Pizzadoro“); PEWP: planta enxertada („Woodstock“ + „Pizzadoro“). Dados originais transformados  $\sqrt{(x + 0,5)^{0,5}}$ .

Com a finalidade de controlar *Ralstonia solanacearum* em tomateiro, Silva (2013), utilizou a combinação porta-enxerto/enxerto („Guardião“ +“ Pizzadoro“) e obteve controle na ordem de 71 % da murcha bacteriana, em solo previamente inoculado com patógeno, enquanto no pé-franco „ Pizzadoro“ não foi verificado nenhum controle, apresentando 100 % das plantas com sintomas nos mesmos.

Lopes et al. (2015) estudaram desempenho em casa de vegetação dos porta-enxertos „Guardião“, „Muralha“, „Protetor“, „Magnet“ e variedade resistente Hawaii 7996 (H7996), em cinco diferentes tipos de isolados (CNPB 322; 476; 488; 489 e 519). Os porta-enxertos que mostraram maior resistência a *Rs* foram „Muralha“, „Guardião“ e Hawaii 7996, em que na maioria dos isolados avaliados tiveram desempenhos semelhantes, e superior em relação aos híbridos „Magnet“ e „Protetor“, sendo que esses, quando testada sua resistência ao isolado CNPB 488, morreram em sua totalidade. Segundo Lopes et al. (2015), alguns híbridos comerciais disponíveis no mercado oferecem significativa proteção contra a MB em situações de baixa pressão de inóculo no solo e/ou em condição de temperatura e umidade pouco favoráveis à doença.

Nakaho et al. (2004) avaliaram colonização 1 cm acima da região da enxertia no „Hawaii 7996“, e constataram ocorrência em 38,7% das plantas inoculadas, embora essas infecções não levaram a sintomas de murcha nas plantas. Entretanto, a cultivar suscetível (pé-franco) apresentou 100% de planta murcha 14 dias após a inoculação com *Rs*. Este experimento sugere que partes sensíveis do caule nos porta-enxertos resistentes, muitas vezes tornam-se infectadas pela bactérias, mas não apresentam sintomas visíveis nas plantas.

Blind et al. (2013) avaliaram o desempenho de resistência genética e produtividade de progênies de tomate do grupo Yoshimatsu resistentes a *Rs*, na cultivar Santa Cruz Kada (suscetível), em solo naturalmente infestado com bactéria, na Amazônia. As progênies avançadas do grupo Yoshimatsu evidenciaram os melhores desempenhos em relação a cultivar Santa Cruz Kada, para características de resistência e análise de capacidade produtiva, sob condições de cultivo em solos naturalmente infestados pelo patógeno *Rs*.

Vale ressaltar que, os porta-enxertos são utilizados principalmente para controlar patógenos de solo, e os mecanismos de defesa estão geralmente associados com a resistência inerente de cada genótipo (KING et al., 2008).

### 6.2.2 Trocas gasosas

No dia da inoculação, as trocas gasosas das plantas pé-franco e enxertadas se mostraram semelhantes, onde não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática (gs,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), taxa de transpiração (E,  $\text{mmol vapor d}^{\circ}\text{ água m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) e a eficiência de carboxilação - EC (Tabela 6).

Aos 3 DAI, houve diferença estatística entre os tratamentos apenas para EC, o PFP apresentou menor valor para esse parâmetro diferindo das plantas enxertadas.

A partir dos 6 DAI, o PFP difere significativamente da PEMP e PEWP, com os menores valores obtidos para quase todos os parâmetros analisados, exceto para Ci de CO<sub>2</sub> na folha. Neste parâmetro, nas duas primeiras avaliações, não houve diferença entre os tratamentos.

Aos 9 e aos 12 dias após a inoculação do patógeno, valores de A mostrou-se negativo no PFP, o que demonstra que as plantas estão apenas respirando, enquanto que na PEWP e PEMP, apesar de redução, as plantas continuaram assimilando CO<sub>2</sub>, demonstrando que a doença não afetou as plantas enxertadas. A mesma tendência foi observada para os parâmetros gs, E, EUA e Ec, onde o PFP apresentou menores valores diferindo das plantas enxertadas. Muito provavelmente essa redução das trocas gasosas nas plantas pé-franco foi em função da maior incidência da murcha bacteriana nessas plantas, onde foram mais prejudicadas em relação às plantas enxertadas.

A Ci no mesofilo foliar é reduzida pelo fechamento estomático, com conseqüente diminuição de A, mas para o PFP foi inversamente proporcional, ou seja, à medida que diminui A aumentou a Ci. O CO<sub>2</sub> estava disponível para as plantas pelos valores altos da Ci, mas as plantas, muito provavelmente devido à doença não estava conseguindo utilizá-lo como se observa nos baixos valores da EC destas plantas.

**Tabela 6.** Valores da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), Condutância estomática (gs), Concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), Taxa de transpiração (E), Eficiência do uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação (Ec) em plantas pé-franco e enxertadas de tomateiro inoculadas com *Ralstonia solanacearum*. (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

| Trat | A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) |          |            |            |           | E ( $\mu\text{mol vapor d' água m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )     |           |           |           |           |
|------|--|----------|------------|------------|-----------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
|      | DAÍ  |          |            |            |           | DAÍ   |           |           |           |           |
|      | 0  | 3        | 6          | 9          | 12        | 0   | 3         | 6         | 9         | 12        |
| PFP  | 27,56 A  | 18,46 B  | -2,81 bC   | -2,81 bC   | -2,07 bC  | 5,63 A  | 6,62 A    | 1,76 bB   | 1,76 bB   | 1,84 bB   |
| PEMP | 27,65 A  | 21,37 AB | 20,68 aB   | 20,68 aB   | 13,40 aC  | 6,59 A  | 7,15 AB   | 5,90 aAB  | 5,90 aAB  | 5,78 aB   |
| PEWP | 29,29 A  | 23,47 AB | 20,30 aB   | 20,30 aB   | 13,34 aC  | 7,08 A  | 6,68 A    | 6,70 aA   | 6,70 aA   | 4,56 aB   |
|      | CV 1 (%) = 30  |          |            |            |           | CV 1 (%) = 19,26  |           |           |           |           |
|      | CV 2 (%) = 23  |          |            |            |           | CV 2 (%) = 17,25  |           |           |           |           |
| Trat | gs ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )             |          |            |            |           | EUA ( $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) |           |           |           |           |
|      | DAÍ  |          |            |            |           | DAÍ   |           |           |           |           |
|      | 0  | 3        | 6          | 9          | 12        | 0   | 3         | 6         | 9         | 12        |
| PFP  | 0,72 A   | 0,80 A   | 0,11 bB    | 0,11 bB    | 0,12 bB   | 4,86 A  | 2,79 B    | -1,54 bC  | -1,54 bC  | -1,16 bC  |
| PEMP | 0,92 A   | 0,73 AB  | 0,53 aBC   | 0,53 aBC   | 0,43 aC   | 4,17 A  | 3,09 AB   | 3,90 aAB  | 3,90 aAB  | 2,35 aB   |
| PEWP | 0,80 A   | 0,78 AB  | 0,55 aB    | 0,55 aB    | 0,54 aB   | 4,15  | 3,61      | 3,07 a    | 3,07 a    | 2,92 a    |
|      | CV 1 (%) = 17,24                                       |          |            |            |           | CV 1 (%) = 58,25  |           |           |           |           |
|      | CV 2 (%) = 24,70                                       |          |            |            |           | CV 2 (%) = 34,81  |           |           |           |           |
| Trat | Ci ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$ )  |          |            |            |           | Ec (A/Ci)   |           |           |           |           |
|      | DAÍ  |          |            |            |           | DAÍ   |           |           |           |           |
|      | 0  | 3        | 6          | 9          | 12        | 0   | 3         | 6         | 9         | 12        |
| PFP  | 289,98 C   | 337,39 B | 418,92 aA  | 418,92 aA  | 414,46 aA | 0,054 A   | -0,006 bB | -0,006 bC | -0,006 bC | -0,006 bC |
| PEMP | 301,23   | 321,32   | 291,64 b   | 291,64 b   | 323,05 b  | 0,094 A   | 0,066 aAB | 0,074 aAB | 0,074 aBC | 0,042 aC  |
| PEWP | 293,86 B   | 326,55AB | 313,14 bAB | 313,14 bAB | 347,84 bA | 0,102 A   | 0,072 aB  | 0,064 aBC | 0,064 aBC | 0,04 aC   |
|      | CV 1 (%) = 10,67                                       |          |            |            |           | CV 1 (%) = 41,96  |           |           |           |           |
|      | CV 2 (%) = 6,42  |          |            |            |           | CV 2 (%) = 27,82  |           |           |           |           |

Letra minúscula compara os tratamentos na coluna e letra maiúscula compara o tratamento na linha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo. CV (%): coeficiente de variação. Trat: tratamentos. PFP: pé-franco („Pizzadoro“; PEMP: planta enxertada („Murilha“ + „Pizzadoro“); PEWP: planta enxertada („Woodstock“ + „Pizzadoro“).

No caso de murcha, as diferenças na apresentação do dossel das folhas nas plantas podem ocorrer alterando assim a capacidade de folhas em receber radiação solar, em assimilar CO<sub>2</sub> e, por conseguinte, afetar produção dos fotoassimilados. Por exemplo, uma diferença na orientação das folhas de plantas infectadas e o impacto sobre a copa da planta nas trocas gasosas e na taxa de crescimento podem ser drásticos (WOODROW et al., 1988).

A redução nas trocas gasosas foi evidenciada em todos os tratamentos, mas principalmente no PFP, onde se observou queda dos valores, possivelmente por ter maior incidência da MB. Segundo Pascholati e Leite (1995), um aumento da atividade fotossintética ocorre no início da infecção da doença, por um período reduzido, e posteriormente, ocorre redução da taxa de fotossíntese.

Na maioria das doenças foliares, a A é reduzida a partir do início da infecção (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007), embora a *Rs* seja um patógeno vascular, também se observou redução de A. Portanto, o aumento da doença interferiu negativamente na assimilação de CO<sub>2</sub>.

Quando há queda da *g<sub>s</sub>* em função da perda de turgescência das folhas doentes, as plantas tendem a regular fortemente a abertura estomática, e com isso reduzem consideravelmente A (MATTOS; LOBO; JOLY, 2002). Segundo Dallagnol et al. (2011), relatam que a redução na *g<sub>s</sub>* limita o influxo de CO<sub>2</sub> às folhas, conseqüentemente diminui A. Redução da *g<sub>s</sub>* implica dizer que, conforme a evolução da doença, a planta, como mecanismo de defesa contra a perda excessiva de água, fechou estômato. O fechamento estomático atua como importante mecanismo de defesa que as plantas apresentam contra perdas exageradas de água para evitar a desidratação das plantas (YORDANOV; VELIKOVA; TSONEV, 2003), e conseqüentemente as plantas transpiram menos.

Laranjeiras infectadas pelo grupo de bactérias *Xylella fastidiosa* que atacam o xilema, mostraram diminuição de A causada pela baixa *g<sub>s</sub>* (RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2003). Em plantas de pimenta inoculadas com *Verticillium dahliae*, verificou-se que a infecção nas raízes aumentou a senescência foliar, diminuição da *g<sub>s</sub>* e da fotossíntese, em comparação ao controle (GOICOCHEA et al., 2000).

Os menores valores de *g<sub>s</sub>* e de E implicam menor perda de água pelas plantas. Estes resultados sugerem que as relações hídricas das plantas foram afetadas pela doença, possivelmente pelo aumento da resistência ao transporte de água. A bactéria

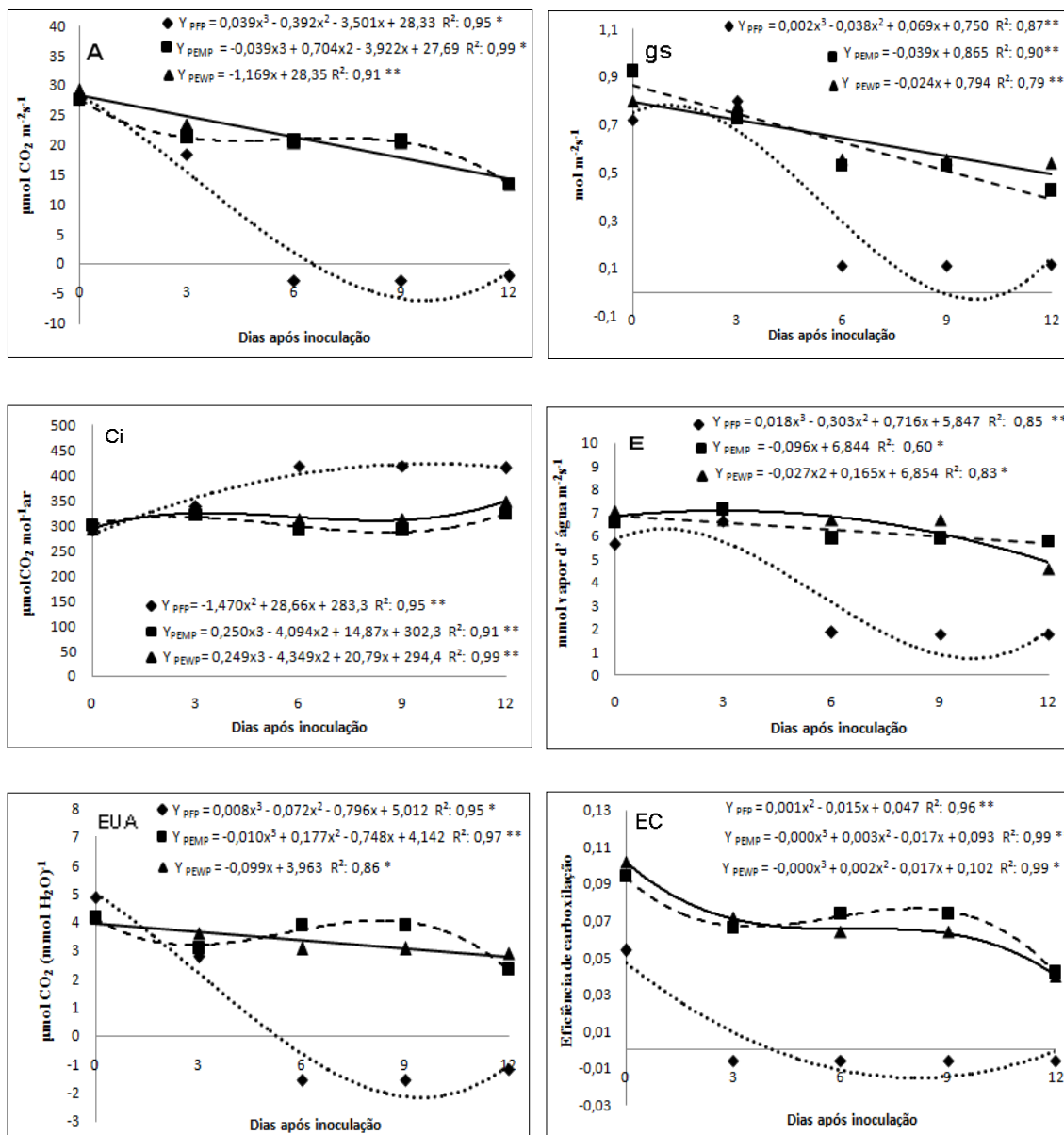
(*R<sub>s</sub>*), ao infectar a planta, aloja-se nos vasos condutores de água (xilema), que resulta da interrupção parcial ou total do fluxo de água desde as raízes até o topo da planta, o que explicaria essa maior resistência ao transporte de água nas plantas como maior severidade da murcha. Segundo Taiz e Zieger (2009), a atividade fotossintética diminui à medida que o potencial hídrico foliar decresce, ocorrendo redução na *g<sub>s</sub>* e, conseqüentemente, na transpiração e na disponibilidade de CO<sub>2</sub> para as reações de carboxilação.

A redução dos parâmetros *A*, *g<sub>s</sub>* e *E* confirmou o efeito prejudicial da infecção causada pela *R<sub>s</sub>* no tomateiro. Outros patógenos também diminuíram a atividade fotossintética nas plantas (BASTIAANS, 1993; MACHADO et al., 1994; SCHOLE; ROLFE, 1996; GODOY; AMORIN; BERGAMIN-FILHO, 2001; RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2003).

Em geral, patógenos vasculares afetam os processos fisiológicos das plantas hospedeiras (DALY, 1976; DUNIWAY, 1976). As relações hídricas de plantas doentes podem ser afetadas em função de distúrbios no funcionamento de estômatos, do aumento da resistência ao fluxo e/ou à absorção de água pelas raízes, tornando as plantas hospedeiras mais sensíveis à deficiência hídrica (SYVERTSEN; BAUSHER; ALBRIGO, 1980; DUNIWAY, 1976; SOUZA et al., 2010).

Para Machado et al. (2005), a *EC* possui estreita relação com a *C<sub>i</sub>* e com *A*. Nesse sentido, foi verificada diminuição da *EC* ao longo dos DAI, devido à diminuição da *g<sub>s</sub>* e *A* no mesmo período.

A redução nos parâmetros fisiológicos ocorreu em função do ataque do patógeno às plantas. Em todos os tratamentos, constatou-se essa diminuição, mas o PFP foi mais afetado do que o PEMP e PEWP (Figura 26).



**Figura 26.** Taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  (A-  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), (gs) condutância estomática (gs,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), (Ci) concentração interna de  $\text{CO}_2$  na folha ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$ ), (E) taxa de transpiração ( $\text{mmol vapor d}^{\text{a}} \text{ água m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), (EUA) eficiência do uso da água ( $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) e (EC) eficiência de carboxilação durante os dias de avaliações. PFF: pé-franco „Pizzadoro“; PEMP: planta enxertada („Muralla“ + „Pizzadoro“); PEWP: planta enxertada („Woodstock“ + „Pizzadoro“). (UNESP-FCA, Botucatu - SP, 2013).

### **6.3 Experimento III – Avaliação da incidência de folhas murcha de tomateiro (%) e produção do tomateiro em diferentes porta-enxertos em solo contaminado naturalmente com *Ralstonia solanacearum* em ambiente protegido no município de Salto – SP**

#### **6.3.1 Incidência da murcha bacteriana**

Na primeira avaliação dez dias após o transplante (DAT) os tratamentos não manifestaram sintomas da doença. Na segunda avaliação (20 DAT), constatou-se a incidência de 20 % das plantas com sintomas da murcha bacteriana (MB) no pé-franco „Forty“ (PFF), diferindo das plantas enxertadas (Tabela 7).

A evolução da doença ocorreu de forma rápida e aos 70 DAT, as plantas PFF já apresentavam 100 % da incidência da murcha bacteriana. O PFF manifestou maior severidade da doença a partir dos 20 DAT até ao final das avaliações, deferindo de todos os tratamentos.

Nas plantas enxertadas, tratou-se das combinações porta-enxertos/enxerto „Woodstock“+„Forty“ (PEWF), „Murilha“+„Forty“ (PEMF) e „Guardião“+„Forty“ (PEGF). Esses porta-enxertos apresentaram resistência a *Ralstonia solanacearum* (Rs), conforme descrito nos catálogos das empresas. Os tratamentos enxertados não apresentaram diferenças entre si até 60 DAT, e tiveram o início da epidemia retardado em comparação ao PFF (Tabela 7).

Aos 70 dias após o transplante, o PEGF apresentou 3,0 % de incidência de murcha, PEMF 4,0 % e PEWF 10,5 %. As PEGF e PEMF foram semelhantes entre si, havendo diferença significativa apenas entre PEGF e PEWF. Aos 80 DAT, os tratamentos PEGF, PEMF e PEWF manifestaram 3,0, 5,8 e 10,5 % de incidência de folhas murchas nos respectivos tratamentos, novamente ocorreu diferença entre os tratamentos conforme observadas na avaliação anterior. Nas plantas enxertadas a quantidade de plantas murchas foi menor. Portanto, pode-se atribuir aos porta-enxertos a resistência contra o patógeno.

**Tabela 7.** Incidência de folhas murcha do tomateiro (%) no tomateiro pé-franco e enxertada em ambiente protegido infectado naturalmente com *Ralstonia solanacearum*. Fazenda Ituaú, Salto - SP, 2014.

| Dias após o transplante |      |       |         |          |          |          |         |         |                                |                |
|-------------------------|------|-------|---------|----------|----------|----------|---------|---------|--------------------------------|----------------|
| Tratamento              | 10   | 20    | 30      | 40       | 50       | 60       | 70      | 80      | Equação de regressão           | R <sup>2</sup> |
| <b>PFF</b>              | 0 aE | 20 aD | 58,5 aC | 72,5 aBC | 85,8 aAB | 93,1 aAB | 100 aA  | 100 aA  | $0,025x^2 + 3,734x - 37,04$ ** | 0,98           |
| <b>PEWF</b>             | 0 aB | 0 bB  | 0 bB    | 0,8 bB   | 1,2 bB   | 4,3 bAB  | 10,5 bA | 10,5 bA | $0,165x - 4,057$ **            | 0,78           |
| <b>PEMF</b>             | 0 a  | 0 b   | 0,8 b   | 1,2 b    | 3,5 b    | 3,5 b    | 4,0 bc  | 5,8 bc  | $0,084x - 1,471$ *             | 0,93           |
| <b>PEGF</b>             | 0 a  | 0 b   | 0 b     | 1,6 b    | 2,3 b    | 3,0 b    | 3,0 c   | 3,5 c   | -                              | ns             |
| <b>F</b>                |      |       |         |          |          | 42,02*   |         |         |                                |                |
| <b>CV 1 (%)</b>         |      |       |         |          |          | 53,95    |         |         |                                |                |
| <b>CV 2 (%)</b>         |      |       |         |          |          | 28,01    |         |         |                                |                |

Letra minúscula compara os tratamentos na coluna e letra maiúscula compara cada tratamento na linha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo. \* e \*\* são significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. Cv (%): coeficiente de variação. Trat: tratamentos. PFF: pé-franco „Forty“; PEWF: planta enxertada („Woodstock“ + „Forty“); PEMF: planta enxertada („Muralha“ + „Forty“); PEGF: planta enxertada („Guardião“ + „Forty“). Dados originais transformados  $\sqrt{(x + 0,5)^{0,5}}$ .

Com relação às plantas enxertadas, foram observados menores índices da doença nos híbridos „Guardião“ e „Muralha“, e esses resultados corroboram os encontrados por Lopes et al. (2015) onde os mesmos constataram menor incidência da doença em relação aos demais porta-enxertos testados („Protetor“, „Magnet“, „Hawaii 7996“).

Resultados diferentes foram verificados por Sirtoli et al. (2011), que avaliaram a resistência a *Rs* de sete porta-enxertos: „R601“, „R602“, „R603“, „Guardião“, „Protetor“, „Spirit“ e „Magnet“. Os porta-enxertos que apresentaram melhores resistência foram „Magnet“ e „R603“ que não manifestaram sintomas da murcha bacteriana (MB). No entanto, a sobrevivência de mais de 90% da testemunha suscetível, ao final do ensaio, mostraram que as condições do experimento não foram favoráveis ao desenvolvimento da doença ou a pressão de inóculo na área era muito baixa.

Mendonça et al. (2005) avaliaram o uso de lobeira, uma planta da família da solanácea, e do acesso de tomateiro „CNPH 1048“ como porta-enxerto para a cultivar (cv) Santa Clara (suscetível a MB). Segundo os autores, não houve presença de plantas murchas nos porta-enxertos lobeira e “CNPH 1048“, já para a cv. Santa Clara (pé-franco) a incidência da MB foi de 81 %.

Deve-se considerar que nem todas as espécies apresentam características morfofisiológicas que possibilitam a enxertia (PEIL, 2003; PINHEIRO; MENDONÇA; SANTANA, 2009). Para Sirtoli (2007), o nível de compatibilidade da enxertia é muito importante para que se tenha sucesso na produção de mudas enxertadas e, conseqüentemente, na produtividade.

Adˆvincula et al. (2011) avaliaram a enxertia de tomate com jiló, utilizando porta-enxerto de *Solanum gilo* Raddi . O porta-enxerto apresentou resistência *Rs* nos enxertos híbridos „Ogata Fukuju“, „Rally“ e „Gold“.

Tomates selvagens com alto nível de resistência à murcha bacteriana foram usados como porta-enxertos de cultivares chinesas. Os porta-enxertos „CH- 2-26“, „CH-2-25“ e „CH-2-21“ apresentaram controle de 100; 86,7 e 80 %, respectivamente, retardando o aparecimento da doença em comparação com pé-franco (LU et al., 1992).

Cardoso et al. (2012) avaliaram quatro genótipos silvestres de tomateiro para a avaliação da resistência da *Rs* utilizando o híbrido Hawaii 7996 (H7996) como testemunha resistente e cv. Santa Clara como testemunha suscetível, por um período

de 65 dias. Apenas o H7996 mostrou-se resistente, e os demais genótipos apresentaram suscetibilidade ao patógeno.

Na Índia, o porta-enxerto CRA 66 reduziu a incidência da murcha bacteriana em tomateiro, e a taxa de sobrevivência das plantas aumentou de 54,5% para 100% de controle; além disso, o rendimento dos tomates com porta-enxertos resistentes foi quatro vezes maior do que a linhagem suscetível (TIKOO et al., 1979).

Em solo naturalmente infestado nos Estados Unidos, a incidência de murcha bacteriana para pé-franco 'Johnson Alemão' foi de 79% e 75% em anos seguidos de cultivo. Quando 'Johnson Alemão' foi enxertado nos porta-enxertos resistentes CRA 66 ou Havaí 7996, não mostraram sintomas da murcha bacteriana nos anos seguintes de cultivo (RIVARD; LOWS, 2008).

Blind et al. (2013) avaliaram o desempenho de resistência genética e a produtividade de progênies de tomate do grupo Yoshimatsu resistentes a *Rs* e a cultivar Santa Cruz Kada (suscetível), em solo naturalmente infestado com bactéria, na região da Amazônia. As progênies avançadas do grupo Yoshimatsu evidenciaram os melhores desempenhos em relação à cultivar Santa Cruz Kada, para características de resistência e análise de capacidade produtiva, sob condições de cultivo, em solos naturalmente infestados pelo patógeno.

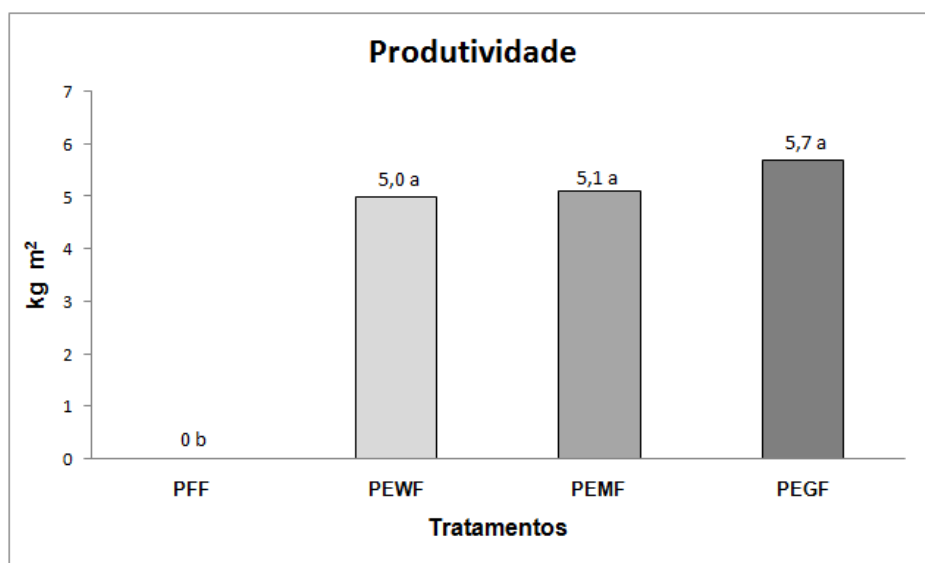
Sirtori (2007), trabalhando com híbrido de pimentão Magali enxertado em três porta-enxertos (AF 8251, AF 8253 e AF 3001), testando resistência a *Rs* (Biovares I e III), concluiu que o AF 8251 se caracterizou como mais resistente dentre os demais porta-enxertos testados.

### 6.3.2 Produtividade

A produtividade do tomateiro ( $\text{kg m}^2$ ) com os tratamentos PFF, PEWF, PEMF e PEGF está ilustrada na Figura 27. As plantas enxertadas não diferiram entre si, mas apresentaram diferença para PFF.

Os resultados da produtividade podem ser explicados pela resistência apresentada pelos porta-enxertos „Woodstock“, „Muralha“ e „Guardião“, comparados com do PFF. O pé-franco não apresentou produção, em virtude de apresentar

100 % das plantas mortas, e enquanto que, nos porta-enxertos com resistência a *Rs*, a incidência da doença foi menor.



**Figura 27.** Produtividade de plantas pé-franco e enxertadas em ambiente protegido com solo naturalmente infectado com *R. solanacearum* em ambiente protegido (Fazenda Ituaú, Salto – SP, 2014). PFF: pé-franco „Forty“; PEWF: planta enxertada „Woodstock“ + „Forty“; PEMF: planta enxertada „Muralha“ + „Forty“; PEGF: planta enxertada „Guardião“ + „Forty. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Cardoso et al. (2006 b) conduziram ensaio em campo aberto, utilizando o híbrido „Hawaii 7996“ como porta-enxerto e as cultivares Santa Clara, Santa Cruz Kada e Débora Plus, suscetíveis a *R. solanacearum*, como enxerto, e observaram que não houve diferença na produção de frutos entre plantas pé-franco e enxertadas.

Mendonça et al. (2005) observaram aumento na ordem de 800% na produção das plantas enxertadas, utilizando a cultivar Santa Clara enxertada no porta-enxerto acesso CNPH 1048, quando comparadas com plantas não enxertadas (pé-franco). Piróg (1986), ao enxertar tomate sobre o porta-enxerto KNVF observou aumento de 30 a 50% na produção das plantas enxertadas em relação às de pé-franco. Rivard et al. (2012) também observaram aumentos na produção das plantas enxertadas em relação ao pé-franco.

Farias (2012), em ensaio com tomateiro, no Estado do Acre, avaliou os porta-enxertos joá, jurubeba-vermelha, jurubebão, jiló e a cv. Santa Adélia, em sistema orgânico, a qual apresentou a morte de 100 % das plantas causadas pela murcha bacteriana. As plantas enxertadas nos porta-enxertos jurubeba-vermelha, jurubebão e jiló apresentaram superioridade significativa com relação ao número de frutos totais, número de frutos comerciais e produtividade, em relação às plantas enxertadas com o porta-enxerto joá. Entretanto, a autora menciona a necessidade de novos estudos com esses porta-enxertos para mais informações sobre crescimento de plantas, vigor, sincronismo da enxertia e qualidade dos frutos.

Sirtori (2007), trabalhando com híbrido de pimentão Magali pé-franco e enxertado em três porta-enxertos (AF 8251, AF 8253 e AF 3001), avaliou a produção de frutos e a produtividade final. A autora destaca que o híbrido Magali enxertado em AF 8251, foi o que apresentou melhores resultados, mesmo inoculado com *Rs*.

Os aumentos de rendimento na berinjela foram constatados com e sem a presença de patógenos do solo. Enxertia de berinjela sobre porta-enxerto selvagem (*Solanum*) mostrou aumentos significativos na produtividade, em comparação com pé-franco (IBRAHIM et al., 2001; RAHMAN et al., 2002).

Quanto à produtividade ( $m^2$ ), extrapolando para hectare, o porta-enxerto Woodstock produziu  $50 t ha^{-1}$ , Muralha  $51,5 t ha^{-1}$  e Guardiã  $55,65 t ha^{-1}$ . Farias (2012) obteve os melhores resultados com jurubeba-vermelha ( $50,0 t ha^{-1}$ ), jiló ( $45,7 t ha^{-1}$ ), jurubebão ( $43,2 t ha^{-1}$ ) e joá ( $13,4 t ha^{-1}$ ).

A comparação de produção com outros trabalhos realizados com tomateiro é apenas um comparativo, pois em função das condições climáticas, porta-enxerto, enxerto, população da bactéria presente no solo, raça fisiológica e biovar, além do manejo feito pelo produtor, podem influenciar nos resultados de produtividade.

### 6.3.3 Classificação dos frutos

Os resultados do número de frutos e massa total, separados por classe (diâmetro equatorial do fruto), estão apresentados na Tabela 8.

Houve diferença significativa entre as plantas enxertadas e pé-franco para os dois parâmetros analisados. As plantas enxertadas mostraram-se semelhantes em relação à quantidade de frutos produzidos por classe e massa total, e foram estatisticamente superiores ao pé-franco.

**Tabela 8.** Número de frutos (NF-m<sup>2</sup>) e massa total (kg-m<sup>2</sup>) por classe do tomateiro avaliada. Salto – SP, 2014. Fazenda Ituaú, Salto – SP, 2014.

| Trat        | Diâmetro equatorial (mm) |        |          |        |          |        |          |       |           |       |
|-------------|--------------------------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|-------|-----------|-------|
|             | 50-60 mm                 |        | 61-70 mm |        | 71-80 mm |        | 81-90 mm |       | 91-100 mm |       |
|             | NF                       | MT     | NF       | MT     | NF       | MT     | NF       | MT    | NF        | MT    |
| PFF         | 0 b                      | 0 b    | 0 b      | 0 b    | 0 b      | 0 b    | 0 b      | 0 b   | 0 b       | 0 b   |
| PEWF        | 5,0 a                    | 0,4 a  | 11,0 a   | 1,3 a  | 13,0 a   | 2,0 a  | 6,0 a    | 1,1 a | 1,0 a     | 0,3 a |
| PEMF        | 5,0 a                    | 0,4 a  | 13,0 a   | 1,3 a  | 13,0 a   | 1,9 a  | 6,0 a    | 1,2 a | 2,0 a     | 0,4 a |
| PEGF        | 4,0 a                    | 0,3 a  | 12,0 a   | 1,2 a  | 15,0 a   | 2,2 a  | 7,0 a    | 1,7 a | 1,0 a     | 0,2 a |
| <b>F</b>    | 25,23*                   | 25,18* | 53,12*   | 51,19* | 50,90*   | 38,29* | 18,70*   | 9,05* | 9,25*     | 8,69* |
| <b>CV %</b> | 32,87                    | 34,14  | 22,50    | 22,91  | 23,13    | 26,59  | 38,05    | 55,58 | 58,97     | 60,82 |

\* indica diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey. CV (%): coeficiente de variação PFF: pé-franco „Forty“; PEWF: planta enxertada („Woodstock“+ „Foty“); PEMF: planta enxertada („Murilha“+ „Forty“); PEGF: planta enxertada („Guardião“+ „Forty“

Sirtori et al. (2011) não observaram diferenças significativas entre plantas enxertadas e pé-franco do tomateiro para a massa média de frutos (kg), no entanto, de forma geral, constataram que a enxertia proporcionou frutos maiores, com exceção do porta-enxerto R602, que apresentou menor massa média de frutos do que o pé-franco (SIRTORI et al., 2011). Cardoso et al. (2006 a) não constataram diferenças para massa média de frutos entre as plantas enxertadas e seus respectivos pés-francos.

Sirtori (2007), trabalhando com plantas enxertadas e não enxertadas de pimenteiro, inoculadas com *Rs*, não observou diferença entre o diâmetro dos frutos.

Na produção em ambiente protegido, berinjela enxertada em tomate melhorou os rendimentos e aumentou o número e o tamanho de frutos, em comparação com as plantas não enxertadas (PASSAM; STYLIANOU; KOTSIRAS, 2005).

Santos (2005), testando diferentes porta-enxertos de pimentão, observou que estes não alteraram as características próprias de cada híbrido comercial.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, é uma das principais doenças em solanáceas, passando a ser uma das importantes doenças em cultivo protegido por todo o Brasil, principalmente nos cultivos sucessivos de tomate ou de outras solanáceas na área, aliada às altas temperaturas no interior dos ambientes, contribuindo para o aumento da população bacteriana no solo.

O controle da doença através da enxertia pode variar em função das condições climáticas (alta temperatura e alta umidade), da alta população do patógeno presente na área, da raça fisiológica e biovar do patógeno, entre outros. Isso foi comprovado no experimento II e III experimentos, onde os mesmos porta-enxertos avaliados na casa de vegetação e em ambiente protegido apresentou controles diferentes da murcha bacteriana.

A planta enxertada tem um preço maior do que a muda pé-franco (sem enxertia) em função do custo de suas sementes, geralmente híbridos, além do custo dessa operação (enxertia). A enxertia pode ser viável economicamente, em áreas com histórico da doença, podendo proporcionar maior produtividade (em relação a plantas não enxertadas), compensando o maior custo da planta enxertada.

Após a contaminação da área pela bactéria, o controle da murcha bacteriana no campo é muito difícil. A utilização de porta-enxertos resistente é um manejo para dirimir a incidência, porém, ela isoladamente não tem a eficiência total. Só a utilização da enxertia como tática de controle não é eficiente, pois nenhuma medida

utilizada isoladamente vai ser capaz de controlar, efetivamente, a doença, por conseguinte, acarretará perdas para o produtor.

Portanto, é necessário realizar o manejo integrado da doença, ou seja, utilização de vários métodos de controle, tais como: manejo adequado da irrigação na área, rotação de culturas com gramíneas, utilização de adubos verdes, matéria orgânica, manejo correto da adubação (evitar excessos, principalmente de nitrogênio), erradicação de plantas daninhas hospedeiras, erradicação das plantas doentes, solarização da área de cultivo, erradicação de plantas doentes, controle de nematóides, dentre outras medidas.

Com a adoção desse manejo integrado, as chances do produtor obter êxito no cultivo do tomateiro em solo contaminado com *Ralstonia solanacearum* são grandes, pois essas medidas não vão eliminar a doença completamente da área, mas ajudará na diminuição da população da bactéria presente no solo e, com isso, o produtor conseguirá produzir, nesses locais contaminados utilizando plantas enxertadas.

Pelos resultados apresentados, com relação à atividade das enzimas SOD, POD, PPO e PAL analisadas nas folhas e no caule, os valores encontrados para o caule foram maiores que nas folhas. Possivelmente, isso comprova a etiologia da bactéria, pois a sua penetração se dá pelas raízes e em seguida há uma multiplicação longitudinalmente no interior do caule. Sabe-se que o patógeno coloniza o vaso do xilema das plantas do tomateiro.

Esses valores maiores no caule possam ser devido ao ataque do patógeno ser no caule, onde o mesmo coloniza o vaso do xilema das plantas do tomateiro, razão pela qual a maior atividade dessas enzimas serem no local do ataque primário do patógeno. (pode retirar esse parágrafo)

Outro ponto relevante quando analisamos as plantas não enxertadas (pé-franco) e enxertadas, observamos que as atividades enzimáticas nas plantas enxertadas foram maiores quando comparada as pé-franco, podendo sugerir que o sistema antioxidante das enxertadas foram mais eficientes na eliminação das EROS.

As avaliações enzimáticas, fisiológicas (trocas gasosas) e produtivas e incidência da murcha bacteriana realizadas nos experimentos I, II e III respectivamente, para trabalhos futuros deveriam ser conduzidas em um único experimento de preferência no campo, possibilitando uma resposta mais completa no campo onde as interações das plantas no campo são mais reais do que experimentos em vaso. Infelizmente

no presente projeto, por motivos de estrutura e logística, a junção dos três experimentos no campo não foi possível.

Com relação ao caule, as análises abaixo e acima do ponto de enxertia são válidas para comparar a atividade nesses locais, podendo inferir que a maior atividade em um local possa estar diretamente relacionada com ataque mais intenso do patógeno. Seria interessante além avaliar as enzimas (SOD, CAT, POD, PPO e PAL), avaliar a colonização do patógeno nesses locais para diagnosticar, se no mesmo tecido do caule colonizado, vai manifestar sintomas da doença na planta.

## 8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos experimentos pode-se concluir que:

### **Experimento I**

As enzimas SOD, PAL para as folhas e o caule, podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos no tomateiro em resposta à infecção da *Ralstonia solanacearum*, respectivamente.

### **Experimento II**

Os porta-enxertos „Muralha“ e „Woodstock“ foram eficientes no controle da murcha bacteriana.

As trocas gasosas nas plantas pé-franco e enxertadas foram reduzidas em função da murcha bacteriana, sendo o pé-franco o mais afetado.

### **Experimento III**

A enxertia mostrou-se um método eficaz no controle da murcha bacteriana em ambiente protegido. Os porta-enxertos „Woodstock“, „Muralha“ e „Guardião“ proporcionaram controle da murcha bacteriana.

A técnica de enxertia demonstrou viabilidade de produção das plantas enxertadas em comparação com plantas pé-franco em ambiente protegido com solo contaminado com *Ralstonia solanacearum*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVINCULA, M. J.; MARTINS, A. D.; VEIGA, F. Controle da murcha bacteriana por meio da enxertia de tomate com jiló no Município de Rio Branco – AC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 7., 2011, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: CBA, 2011. p.1-4.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**: consultoria e informações de agronegócios. São Paulo: FNP, 2015. 482p.

AGRIOS, G. N. **Plant pathol.**, 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Elsevier 2005, 948 p.

ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Tomate**: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia. Lavras: UFLA, 2004b. p.14-23.

APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions – the importance of oxidation. **J. Chem. Ecol.**, v. 19, p. 1521-1552, 1993.

BABU, M. et al. Altered gene expression changes in *Arabidopsis* leaf tissues and protoplasts in response to *Plum pox* virus infection. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1-21, 2008.

BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen and pathogenesis in plants. In: Stacey, G.; Keen, N.T. (Eds.). **Plant microbe interactions**. St. Paul: APD Press, 1999. p.81-119.

BASTIAANS, L. Effects of leaf blast on photosynthesis of rice leaf photosynthesis. **J. Plant Pathol.**, v. 99, p.197–203, 1993.

BEAUCHAMP, C. O.; FRIDOVICH, I. Isoenzymes of superoxidase dismutase from wheat germ. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 317, p. 50- 64, 1973.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **J. Exp.Botany**, v.58, p.4019-4026, 2007.

BLETOS, F. A. Use of grafting and calcium cyanamide as alternatives to methyl bromide soil fumigation and their effects on growth, yield, quality and fusarium wilt control in melon. **J. Phytopathol.**, v. 153, n. 3, p.155-161, 2005.

BLIND, A. D. et al. Avaliação de linhagens e cultivares de tomate resistentes à murcha bacteriana (*Rasltonia solanacearum*) desenvolvidas na Amazônia. **Enciclopéd. Biosfera**, v.9, n. 16, p.400-420, 2013.

BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.5, p.44-50, 2002.

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Sci.**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. Rockville, American Society of Plant Physiologists, 2000, p. 1367.

BUDDENHAGEN, I. W.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.2, p. 203-231, 1964.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, J.; EVERSE, K. E.; GRISHAM, M. B. (Eds.). **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 25-50.

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa, 2003. Comunicado Técnico, 87.

CAÑIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Comparação de métodos de enxertia em pepino. **Horticult. Bras.**, v. 20, p. 95-99, 2002.

CAÑIZARES, K. A. L. Fisiologia do processo de enxertia. In: GOTO, R.; SANTOS, H. S.; CAÑIZARES, K. A. L. **Enxertia em hortaliças**. São Paulo: UNESP, 2003. cap.4, p.21-23.

CAÑIZARES, K. A. L.; VILLAS BÔAS, R. L. Aspectos nutricionais em hortaliças enxertadas. In: GOTO, R.; SANTOS, H. S.; CAÑIZARES, K. A. L. **Enxertia em hortaliças**. São Paulo: UNESP, 2003. cap. 7. p.41-45.

CARDOSO, S. C. et al. Qualidade de frutos de tomateiro com e sem enxertia. **Bragantia**, v.65, p.269-274, 2006 a.

CARDOSO, S. C. et al. Viabilidade de uso do híbrido hawaii 7996 como porta-enxerto e cultivares comerciais de tomate. **Bragantia**, v. 65, p. 89-96, 2006 b.

- CARDOSO, S. C. et al. Evaluation of tomato rootstocks and its use to control bacterial wilt disease. **Rev. Semina**, v. 33, p. 595-604, 2012.
- CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. 650p.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.81-124.
- CENTRO DE QUALIDADE EM HORTICULTURA. CEAGESP. **Programa brasileiro para modernização da horticultura normas de classificação do tomate**. São Paulo: Centro de Qualidade em Horticultura/CEAGESP, 2003.
- CHAGAS, R. M. **Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharumofficinarum* L.) tratadas com paraquat**. 2007. 82 f. Tese (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- CHEN, Q.; WENG, Q.; HU, F. Biochemical mechanism of induced resistance to tomato bacterial wilt with the treatment of avirulent strains of *Ralstonia solanacearum*. Journal Fujian Agricultural Forestry University, **Nat. Sci.**, v. 32, n. 3, p. 296-300, 2003. Disponível em <http://europepmc.org/abstract/CBA/546761>. Acesso em: 8 jun. 2015.
- CULTIVO protegido versus campo aberto: vantagens e desvantagens do cultivo protegido frente ao sistema convencional. **Hortifruti Brasil**, v. 12, n. 132, mar. 2014. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/132/full.pdf>>. Acessado em: 23 mar. 2015.
- DALLAGNOL, L. J et al. Alterations on Rice leaf physiology during infection by Bipolaris oryzae. **Aust. Plant Pathol.**, v.40, p.360-365, 2011.
- DALY, J. M. The carbon balance of diseased plants: changes in respiration, photosynthesis and translocation. In: HEITFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. (Eds.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1976.p.450-479. v. 4: Physiological plant pathology.
- DAUHTREY, M. Southern Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. In: ANNUAL CONFERENCE ON INSET DISEASE MANAGEMENT ON ORNAMENTALS, 19, 2003, Alexandria. **Proceedings...**Alexandria: Society of American Florists, 2003.
- DENNY, T. P. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: \_\_\_\_\_. **Plant-associated bacteria**. Dordrecht: Springer Verlag, 2006.p.573-644.
- DO, H. M. et al. Expression of peroxidase like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in *Capsicum annuum*. **Mol. Plant. Microbe Int.**, v.16, p. 196-205, 2003.

DORAIS, M.; GOSSELIN, A.; PAPADOPOULOS, A. P. Greenhouse tomato fruit quality. **Horticult. Rev.**, v.26, p. 239-306, 2001.

DUNIWAY, J. M. Water status and imbalance. In: HEITFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. (Eds.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin-Heidelberg: Springer, 1976.p.430-449. v. 4: Physiological plant pathology.

EHSANI-MOGHADDAM, B. et al. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. **J. Plant Physiol.**, v. 163, p. 147-153, 2006.

FARIAS, E. A. P. **Cultivo do tomateiro sob diferentes porta-enxertos em sistema orgânico de produção**. 2012. 24 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2012.

FERGAN, M.; PRIOR, P. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASE, 1., 2004, Orlando. **Proceedings...** Leuven: International Society for Horticultural Science, 2004. p. 127-136.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. 421p.

FIKRET, Y.; MANAR, T. S.; EBNEK, K.; ÖZLEM, U. SOD, CAT, GR and APX enzyme activities in callus tissues of susceptible and tolerant eggplant varieties under salt stress. **Res. J. Biotech**, v. 8, p.45–51. 2013.

FOYER, C. H.; GALTIER, N. Source-sink interaction and communication in leaves. In: ZAMSKI, E; SCHAFFER, A. A. (Eds.) **Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships**. New York: Basel, 1996. p. 331-340.

GASPAR, T. et al. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiol. Plant.**, v. 64, p. 418-423, 1985.

GIANNAKOU, I. O.; KARPOUZAS, G. Evaluation of chemical and integrated strategies as alternatives to methyl bromide for the control of root-knot nematodes in Greece. **Pest Manag. Sci.**, v. 59, n. 8, p.883-892, 2003.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatol. Bras.**, v. 26, p.209-215, 2001.

GOICOECHEA, N. et al. *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. **J. Plant Pathol.**, v.106, p. 19-25. 2000.

GOTO, R. **Qualidade e produção de frutos de pepino japonês em função dos métodos de enxertia**. 2001. 60 f. Tese (Livre Docência)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

GOTO, R. **Injertos de hortaliças em Brasil, pimentão**. Série Documentos, injertos de hortaliças. 2011. Disponível em: <[http://www.poscosecha.com/es/publicaciones/injerto-de-hortalizas-en-brasil/\\_id:6/](http://www.poscosecha.com/es/publicaciones/injerto-de-hortalizas-en-brasil/_id:6/)>. Acesso em: 25 mar. 2015.

GOTO, R.; SANTOS, H. S.; CAÑIZARES, K. A. L. **Enxertia em hortaliças**. Botucatu: Editora: UNESP, 2003. p.85.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Funct. Plant Biol.**, v. 32, p. 481-494, 2005.

GHAN, W.; ZHAO, X. Defense mechanisms involved in disease resistance of grafted vegetables. **HortSci.**, v. 47, n. 2, p.164-170, 2012.

HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 27, p. 265-277, 1964.

HE, Y. et al. Grafting increases the salt tolerance of tomato by improvement of photosynthesis and enhancement of antioxidant enzymes activity. **Environ. Exp. Bot.**, v. 66, p. 270-278, 2009.

HE, L.Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Dis.**, v. 67, p. 1357-1361, 1983.

HIRAGA, S. et al. An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. **Mol. PlantMicrobe Interact.**, v. 13, p. 210-216, 2000.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol.**, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HUNT, M. D. et al. DNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. **Plant Mol. Biol.**, v. 21, p. 59-68, 1993.

HURA, K. et al. Induction of defense mechanisms in seedlings of oilseed winter rape inoculated with *Phoma lingam* (*Leptosphaeriamaculans*). **Phytoparasitica**, v. 253, p. 145-154, 2013.

IBRAHIM, M. et al. Seed germination and graft compatibility of wild rootstock as tomato. **J. Biol. Sci.**, v.1, p.701-703, 2001.

IRISARRI et al. Oxidative stress associated with rootstock-scion interactions in pear/quince combinations during early stages of graft development. **J. Plant Physiol.**, v. 176, p. 25-35, 2015.

JANICK, J. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: USAID, 1966. 485 p.

- JIANG, F. et al. Relations hip between root rot resistance and phenylaprapanoid metabolism in graft capsicum. **China Veg.**, v. 8, p.46–52, 2010.
- JIANG, J. F.; LI, J. G.; DONG, Y. H. Effect of calcium nutrition on resistance of tomato against bacterial wilt induced by *Rasltonia solanacearum*. **J. Plant. Pathol.**, v.136, p. 547-555, 2013.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescense. **Plant Physiol.**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KAVITHA, R.; UMESHA, S. Regulation of defense-related enzymes associated with bacterial spot resistance in tomato. **Phytoparas.**, v. 36, n. 2, p.144-159, 2008.
- KAWAIDE, T. Utilization of rootstocks in cucurbits production in Japan.**Japan Agricult.Res. Q.**, v. 18, p. 284-289, 1985.
- KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography.**Tech. Bull. North Caroline Agricult. Exp. Stat.**, n. 99, p. 194, 1953.
- KING, S. R. et al. Grafting for disease resistance. **HortSci.**, v.43, n. 6, p. 1673–1676, 2008.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro (*Lycopersiconesculentum* Mill) In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Editora Ceres, 2005. p. 607-626.
- KUZNIAK, E.; SKLODOWSKA, M. Fungal pathogen- induce changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. **Planta**, v. 22, p. 192-200, 2005.
- LEE, J. M. Cultivation of grafted vegetables. 1: current status, grafting methods, and benefits. **HortScience**, v. 29, p. 235-239, 1994.
- LEE, S. H.; KIM, E. S.; LEE, M. Y. Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. **Phytochemistry**, v. 58, p. 859-864, 2001.
- LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; OLIVEIRA, A. M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolusvulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, p. 21-25, 1999.
- LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticult. Bras.**, v. 33, n. 1, p. 125-130, jan./mar, 2015.
- LOPES, C. A. Ocorrência de doenças em plantas sob cultivo protegido. **Summa Phitopatol.**,v.22, p.81-82, 1996.

- LOPES, C. A.; ROSSATO, M. **Diagnóstico da Ralstonia solanacearum em tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013. (Comunicado Técnico, 92). Disponível em: <[http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie\\_documentos/publicacoes2013/cot\\_92.pdf](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_92.pdf)>. Acessado em: 5 abr. 2015.
- LOPES, C. A.; DUVAL, A. M. Q. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: ZAMBOLIM, L. et al.(Eds.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 502p.
- LU, M. Q. et al. An experiment using grafting for control of tomato bacterial wilt. **Plant Protect.**, v. 18, p. 3-25, 1992.
- MACHADO, E. C. et al. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994.
- MACHADO, E. C. et al. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesqui. Agropec. Bras**, v. 40, n. 12, p. 1161- 1170, 2005.
- MALAVOLTA JUNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathol.**, v. 34, n. esp., supl., p. 1-88, 2008.
- MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of alga cells. **J. Plant Physiol.**, v. 157, p. 183-193, 2000.
- MANDAL, S. R. K.; MISHRA, S. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 49, p. 117-123, 2011.
- MARGIS-PINHEIRO, M. et al. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciênc. Hoje**, v. 25, p. 24-31, 1999.
- MARTINS, S. R. et al. Caracterização climática e manejo de ambientes protegidos: a experiência Brasileira. **Inf. Agropec.**, v. 20, p. 15-23, 1999.
- MATTOS, E. A.; LOBO, P. C.; JOLY, C. A. Overnight rainfall inducing rapid changes in photosynthetic behaviour in a cerrado woody species during a dry spell amidst the rainy season. **Aust. J. Bot.**, v. 50, p. 1-6, 2002.
- MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.
- MENDONÇA, J. L. et al. Avaliação da lobeira (*Solanum lycocarpum* St Hill.) e do tomateiro 'CNPH 1048' como porta-enxerto para cultivares de tomateiro em solo infestado com RS (*R. solanacearum*). **Horticul. Bras.**, v. 23, n. 2, supl., 2005. CD-ROM
- MENDONÇA, S. C.; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Bol. Sbcta.**, v. 37, n. 2, p. 113- 116, 2003.

- MIGUEL, A. G. **Injerto de hortalizas**. Valencia: Generalitat Valenciana, 1997. 88 p. (Divulgación Técnica, 40).
- MIRANDA, E. F. O.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas in vitro e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. **Fitopatol. Bras.**, v. 29, p. 121-127, 2004.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trend. Plant Sci.**, v. 9, p. 490-498, 2004.
- MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-91. 2001.
- MURGIA, I. et al. Arabidopsis thaliana plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. **Plant J.**, v. 38, p. 940-953, 2004.
- NAKAHO, K. et al. Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. **J. Gene. Plant Pathol.**, v.70, p.115-119, 2004.
- NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **J. Plant Res.**, v. 114, p. 323-328, 2001.
- NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos, herbívoros e fitopatógenos. **Agrar. Acad.**, v. 1, n. 1, p.237-250, 2014.
- OLMOS, E. et al. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **J. Exp. Bot.**, v. 54, p. 291-301, 2003.
- OROBER, M. et al. **Induction of systemic acquired resistance in cucumber by foliar phosphate application**. In: International Reinhardtsbrunn Symposium, 12, 1999. II Modern fungicides and antifungal, p.339- 348, 1999.
- PANDHAIR, V.; SEKHON, B.S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. **J. Plant Biotechnol.**, v. 15, p.71-78, 2006.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia princípios e conceitos**. São Paulo: Editora: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 417-454, 1995.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. 1<sup>a</sup>. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 2008. 627 p.
- PASSAM, H. C.; STYLIANOU, M.; KOTSIRAS, A. Performance of eggplant grafted on tomato and eggplant rootstocks. **E. J. Hort. Sci.**, v.70, p. 130-134, 2005.

PEIL, R. M. A enxertia na produção de mudas de hortaliças. **Ciênc. Rural**, v.33, n.6, p. 1169-1177, 2003.

PEIXOTO, E. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.11, p.137-143, 1999.

PINHEIRO, J. B.; MENDONÇA, J. L.; SANTANA, J. P. Solanáceas Silvestres: Potencial de Uso como Porta-Enxertos Resistentes ao Nematóide-das-Galhas (*Meloidogynespp.*). **Bol. Pesqui. Desenvol.**, n. 57, p. 7-19, 2009.

PIRÓG J. The influence of seedling grafting, date of planting and cultivar on tomato yield. **Roczniki Akademia Rolnicza Poznaniu**, v. 165, p.91-106, 1986.

RAHMAN, M. A et al. Performance of some grafted eggplant genotypes on wild *Solanum* root stocks against root-knot nematode. **J.Biol. Sci.**, v. 2, p. 446-448, 2002.

RAIJ, B. Van. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.p. 906.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas à patógenos. **Fitopatol. Bras.**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

REZENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H., AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed). Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: v. 2, p. 435-443. 2005.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Early photosynthetic responses of sweet range plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiol. Mol. PlantPathol.**, v.62, p.167-173, 2003.

RIVARD, C. L et al. Grafting tomato to manage bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in the southeastern United States. **Plant Disease**, v. 96, p.973-978, 2012.

RIVARD, C. L.; LOWS, F. J. Grafting to manage silborne diseases in heirloom tomato production. **HortSci.**, v. 43, n. 7, p. 2104-2111, 2008.

SAATHOFF, A. J. et al. Towards uncovering the roles of switch grass peroxidases in plant processes. **Front. Plant Sci.**, v. 4, p. 1-12, 2013.

SALANOUBAT, M. et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, v. 415, p. 497-502, 2002.

SANTOS, H. S. et al. (Org.). **Enxertia em hortaliças**. São Paulo: Editora UNESP, 2003. p.15-19.

SANTOS, H. S. **Desempenho agrônômico e marcha de absorção de nutrientes em plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) enxertadas em porta-enxertos resistentes a patógenos de solo.** 2005. 73 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

SCANDALIOS, J. G. et al. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Sci.**, v. 156, p. 103-110, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHOLES, J.; ROLFE, S. A. Photosynthesis in localized regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. **Planta**, v.199, p.573-582, 1996.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Eds.). **Interação planta patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SILVA, E. S. **Enxertia no controle da murcha bacteriana, na atividade de enzimas e produção em tomateiro.** 2013. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia- Horticultura), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatol. Brasi.**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SIRTOLI, L. F. **Influencia da enxertia, em relação à Murcha Bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* no desenvolvimento e produtividade do pimentão em cultivo protegido.** 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Ciências agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Candido Rondon, 2007.

SIRTOLI, L. F. et al. Enxertia no desenvolvimento e qualidade de frutos de tomateiro sob diferentes porta-enxertos em cultivo protegido. **Scient. Agrar. Paranaensis**, v. 10, p. 15-22, 2011.

SMITH, E. W. **A bacterial disease of the tomato, eggplant and irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.).** Washington: Government Printing Office, U. S. Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology, p. 1-28, 1986.

SOUZA, J. A. R.; MOREIRA, D. A.; COELHO, D. F. Crescimento e desenvolvimento de tomateiro fertirrigado com água residuária da suinocultura. **Ambi-Agua**, v. 5, n. 2, 144-157, 2010.

STEFFENS, J. C.; HAREL, E.; HUNT, M. D. Polyphenol oxidase. In: ELLIS, B. E.; KUROKI, G. W.; STAFFORD, H. A. **Recent advances in phytochemistry**. v. 28. Genetic engineering of plant secondary metabolism. New York: Plenum Press, 1994. p. 275-312.

STICHER, L.; MAUCHI-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Sistemic acquired resistance. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 35, p.235-270, 1997.

SYVERTSEN, J. P.; BAUSHER, M. G.; ALBRIGO, L. G. Water relations and related leaf charecteristics of healthy and blight affected citrus trees. **J. Am. Soc. Horticult. Sci.**, v. 105, p. 431-434, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed. Editora: ARTMED S. A, 2009. 819p.

TAKATSU, A.; LOPES C. A. Murcha bacteriana das hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticult. Bras.**, v. 15, supl., p. 170-177, 1997.

TAYLOR, I. B. Biosystematic of the tomato. In: ATHERTON, I.G.; RUDICH, I.(Eds.). **The tomato crop' a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, 1986. p. 1- 34.

THIPYAPONG, P.; STOUT, M. J.; ATTAJARUSIT, J. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1569-1595, 2007.

TIKOO, S. K.; MATHAI, P. J.; KISHAN, R. Successful graft culture of tomato in bacterial wilt sick soils. **Current Sci.**, v. 48, p. 259-260, 1979.

VANITHA, S. C. et al. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. **J. Phytopathol.**, v. 157, p. 552-557, 2009.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defence related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathol**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VECCHIA, P. T. D.; KOCH, P. S. História e perspectivas da produção de hortaliças em ambiente protegido no Brasil. **Inf. Agropec.**,v. 20, p. 5-10, 1999.

VON CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v. 153, n. 4, p. 376-387, 1981.

WILLIAMSON, L. et al. Ralstonia solanacearum race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. **Plant Dis.**, v. 86, p. 987-991, 2002.

WOODROW, L.; THOMPSON, R. G.; GRODZINSKI, B. Effects of ethylene on photosynthesis and partitioning in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. **J. Exp. Bot.**, v. 39, p. 667-684, 1988.

ZAMBOLIM, L.; CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. **Inf. Agropec.**, v.20, n.200/201, p.114-25, 1999.

ZAMBOLIM, L., et al. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas-hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p.373-407.

YABUUCHI, E. et al. Transfer of two *Burkholdeira* and naalcafigenes species to *Ralstonia* gen. Nov: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) Comb. Nov. *Ralstonia solanacearum* (Smitch 1986) comb.nov.and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. **Microbiol. Immunol.**, v.30, p.897-904, 1995.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bul. J. Plant Physiol.**, (Special Issue), p.187-206, 2003.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. **J. Food Biochem.**, v. 27, n. 5, p. 361- 422, 2003.

YOSHIDA, K. et al. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p.665-670, 2003.

YOSHIMURA, K. et al. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants over expressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. **Plant J.**, v. 37, p. 21-33, 2004.