

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

TARSIS DE AGUIAR

**FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FUNGOS
(*Saccharomyces cerevisiae*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula
edodes*) NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO
(*Solanum lycopersicon*) CONTRA *Xanthomonas gardneri***

Florianópolis, SC

2016

Tarsis de Aguiar

FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FUNGOS
(Saccharomyces cerevisiae, Pleurotus ostreatus e Lentinula edodes)
NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO (*Solanum*
*lycopersicon) CONTRA *Xanthomonas gardneri**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Robson M. Di Piero

Florianópolis, SC

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Aguiar, Tarsis
FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FUNGOS (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*) NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicon*) CONTRA *Xanthomonas gardneri* / Tarsis de Aguiar ; orientador, Robson M. Di Piero - Florianópolis, SC, 2016. 146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. POLISSACARÍDEOS. 3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA. 4. TOMATEIRO. 5. MANCHA BACTERIANA. I. Di Piero, Robson M.. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE FUNGOS
(Saccharomyces cerevisiae, Pleurotus ostreatus e Lentinula edodes)
NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicon*) CONTRA *Xanthomonas gardneri*

POR

TARSIS DE AGUIAR

Banca Examinadora:

Qualidade	Titulação/Nome	Deptº/Centro/Instituição
Presidente (Orientador)	Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero	FIT/CCA/UFSC
Membro (Externo à Universidade)	Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro	UTFPR
Membro (Externo à Universidade)	Prof. Dr. Nelson Arno Wulff	FUNDECITRUS
Membro (Externo ou Interno ao Programa)	Dr. Eder Carlos Schmidt	PPGBCD/CCB/UFSC
Membro (do Programa)	Prof. Dr. Marciel J. Stadnik	FIT/CCA/UFSC
Membro (do Programa)	Dr. Aline Cristina Velho	FIT/CCA/UFSC

Florianópolis, 30 maio 2016

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais Gilberto e Maria,
pelo suporte em todas as ocasiões.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Robson M. Di Piero por sua paciência, ensinamentos, confiança e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UFSC por toda colaboração, amizade e convivência.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Laboratório de Biologia Celular Vegetal e Laboratório Central de Microscopia Eletrônica pelos auxílios no decorrer deste trabalho.

Às empresas Eagle Flores, Frutas & Hortaliças, Sakata Seed Sudamerica, Agrocinco Seeds of Value e Syngenta por disponibilizarem as sementes utilizadas nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Márcio José Rossi (MIP-UFSC), Sra. Juliane (Cerveja Amanita) e Sr. Gustavo (Cogumelos da Gula) por fornecerem os materiais utilizados neste trabalho.

Aos meus pais Gilberto e Maria, que sempre incentivaram na realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Kalebe, Théó e Isabela pelo carinho e motivação.

Ao meu companheiro Helton pelo amor e paciência.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Ao pé de tomateiros, não há maus cozinheiros."
(Provérbio Português)

RESUMO

No panorama atual das necessidades de produção agrícola para alimentação humana, são adotadas práticas que afetam a conservação da biodiversidade no planeta. Na cultura do tomate, um dos vegetais mais consumidos no mundo, não é diferente, sendo que para o controle de fitopatógenos são utilizadas numerosas aplicações de agroquímicos que causam danos ao homem e o ambiente. Dentre as principais doenças que afetam as áreas de cultivo do tomateiro, está a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas gardneri*. Elictores de origem biológica, como os polissacarídeos, têm se mostrado como alternativa interessante na ativação dos mecanismos de defesa vegetal. O uso de elicitores nos sistemas de interação planta e patógeno foi avaliado no presente trabalho, através da ação de frações polissacarídicas obtidas a partir de sólidos residuais de cervejaria à base de *S. cerevisiae* (PRC), do substrato de cultivo do cogumelo *P. ostreatus* (PSPO) e basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) no controle da mancha bacteriana no tomateiro. As frações polissacarídicas foram caracterizadas, sendo que somente a PSHII apresentou indícios de ação direta sobre o patógeno, devido à redução no número de unidades formadoras de colônia (UFCs) do patógeno *X. gardneri in vitro*, provavelmente relacionada aos seus altos teores de compostos fenólicos e ao potencial antioxidante. Em plantas suscetíveis foram avaliados o efeito do intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação (4 ou 7 dias) e as concentrações do polissacarídeo (0; 0,5; 1,5 ou 4,5 mg/mL) sobre a severidade da doença (%). PRC, PSPO e PSHII (1,5 mg/mL) reduziram a severidade da mancha bacteriana em cotilédones, em plantas jovens (no início do crescimento vegetativo) e em plantas com a presença de cinco folhas definitivas entre 44,8% e 51,2%. Além disso, PRC e PSHII (1,5 mg/mL) diminuíram a severidade da doença (49,6 e 57,2 %) em todas as cultivares testadas (Santa Cruz Kada, Natália, BRS Sena, e Forty). A cultivar BRS Sena apresentou os menores valores de severidade da doença independente do tratamento. PSHII aumentou a atividade de peroxidases e do conteúdo de fenóis totais na cultivar Santa Cruz Kada. Sobre parâmetros fotossintéticos, o efeito de PSHII resultou em menores taxas de condutância estomática e transpiração em relação à testemunha, momentos antes da inoculação. Nos estudos histopatológicos em genótipos de tomateiros, BRS Sena apresentou os

maiores valores nos aspectos anatômicos analisados (densidade estomática, espessura do mesófilo e de células paliçádicas) em relação à Santa Cruz Kada. Em BRS Sena, as secções foliares coradas com azul de toluidina e ácido periódico de Schiff apresentaram reações de hiperplasia e hipertrofia celular próximas ao local da infecção por *X. gardneri* e acúmulo de compostos fenólicos nas células do interior do mesófilo. Entretanto, em Santa Cruz Kada e Natália, o acúmulo de compostos fenólicos foi observado em células próximas à epiderme. O estudo traz informações de apelo sustentável para o uso de polissacarídeos obtidos a partir de resíduos de origem fúngica, capazes de conferir proteção em cultivares de tomateiro contra a mancha bacteriana por indução de resistência e esclarece alguns mecanismos de defesa constitutiva encontrados nas plantas a fim de combater a infecção bacteriana.

Palavras-chave: Polissacarídeos; Levedura de cervejaria; Substrato de cultivo de cogumelos; Basidiocarpos; Indução de resistência; Tomateiro; Mancha bacteriana.

ABSTRACT

In the current agricultural needs for food production, practices that affect the conservation of biodiversity on the planet are adopted. In tomato crop, one of the most consumed vegetables in the world, it is not different, and numerous applications of agrochemicals are used for plant pathogen control which cause damage to man and the environment. Bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* is one of the main diseases affecting tomato growing areas. Elicitors from biological origin, such as polysaccharides have been shown as an interesting alternative in the activation of plant defense mechanisms. The use of elicitors in plant pathogen interaction systems has been evaluated in this study, through the action of polysaccharide fractions obtained from brewery waste solids based on *S. cerevisiae* (PRC), the spent mushroom substrate of *P. ostreatus* (PSPO) and basidiocarps discarded from *L. edodes* production (PSHII) to control bacterial spot on tomato plants. Polysaccharide fractions have been characterized, but only PSHII has showed evidence of direct action on the pathogen, because of the reduction on the number of the pathogen *X. gardneri* *in vitro*'s colony forming units (CFUs), probably due to its high content of phenolic compounds and antioxidant potential. In susceptible plants the effect of the time interval between treatment and inoculation (4 or 7 days) and the polysaccharide concentration (0, 0.5, 1.5 or 4.5 mg/mL) were evaluated over the disease severity (%). PRC, PSPO and PSHII (1.5 mg/mL) have reduced the severity of the bacterial spot on cotyledons, seedlings (at the beginning of vegetative growth) and plants with five true leaves between 44.8 and 51%. In addition, PRC and PSHII (1.5 mg/mL) have decreased disease severity (49,6 e 57,2 %) in all tested cultivars (Santa Cruz Kada, Natalia, BRS Sena and Forty). BRS Sena had the lowest disease severity values independent of the treatment. PSHII has increased the activity of peroxidases and the content of total phenols in Santa Cruz Kada plants. On photosynthetic parameters, the effect of PSHII has resulted in lower rates of stomatal conductance and transpiration compared to control plants, moments before inoculation. Histopathological studies in tomato genotypes, BRS Sena has showed the highest values on the anatomical aspects analyzed (stomatal density, mesophyll and palisade cells thickness) compared to Santa Cruz Kada. Also, hyperplasia and hypertrophy reactions near the infection site of

X.gardneri and phenolic compounds accumulation have been observed inside of mesophyll cells in BRS Sena leaf sections stained with toluidine blue and periodic acid-Schiff. However, in Santa Cruz Kada and Natalia, phenolic compounds accumulation was observed in cells close to the epidermis. The study provides sustainable information for using polysaccharides obtained from fungal waste, able to confer protection in tomato cultivars against bacterial spot by induced resistance and clarifies some constitutive defense mechanisms found in plants in order to fight against bacterial infection.

Keywords: Polysaccharides; Brewer's yeast; Spent mushroom substrate; Basidiocarps; Induced resistance; Tomato plants; Bacterial spot.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1 Lista de cultivares de tomateiro utilizadas nos ensaios de resistência genética.....	52
Tabela 2.2 Caracterização de polissacarídeos extraídos de resíduo cervejeiro (PRC), substrato de cultivo de <i>P. ostreatus</i> (PSPO) e basidiocarpos residuais do cultivo de <i>L. edodes</i> (PSHII) quanto ao teor de proteínas, carboidratos totais, intensidade de dispersão (Kcps), pH, potencial Zeta (mV), condutividade (mS/cm), fenólicos totais (μg EAG), captura de DPPH (%) livre.....	58
Tabela 2.3 Principais vibrações características dos grupos funcionais associados na superfície dos polissacarídeos PRC, PSPO e PSHII nos espectros FTIR.....	60
Tabela 2.4 Número de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFCs/mL) de <i>X. gardneri</i> após diferentes tempos de contato (0, 2, 4, e 6h) com polissacarídeos extraídos de basidiocarpos residuais da produção de <i>L. edodes</i> (PSHII à 0; 0.25; 0.75 e 2.25 mg/mL).....	61
Tabela 2.5 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por <i>X. gardneri</i> em cotilédones e plantas de tomateiro (cv. Santa Cruz Kada) tratadas com os polissacarídeos de resíduo cervejeiro (PRC), de substrato após cultivo de <i>P. ostreatus</i> (PSPO) e de basidiocarpos residuais do cultivo de shiitake (PSHII) em relação ao controle (não tratado) Florianópolis, 2015.....	62
Tabela 2.6 Severidade da mancha bacteriana causada por <i>X. gardneri</i> em plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada tratadas com polissacarídeos de resíduo cervejeiro (PRC), do substrato de <i>P. ostreatus</i> (PSPO) e de basidiocarpos residuais de <i>L. edodes</i> (PSHII), nas concentrações 0,5 e 1,5 mg/mL, com os intervalos entre tratamento e inoculação de 4 e 7 dias.....	63
Tabela 2.7 Efeito de polissacarídeos extraídos a partir de basidiocarpos residuais do cultivo de <i>L. edodes</i> (PSHII) nas concentrações 0; 0,5; 1,5 e 4,5 mg/mL sobre a severidade da mancha bacteriana (cv. Santa Cruz Kada). Florianópolis, 2014.....	64
Tabela 2.8 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por <i>X. gardneri</i> nas cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Forty, Natália e BRS Sena; após a pulverização de água destilada (H_2O), ASM (50 mg/L), polissacarídeos (1,5 mg/mL) extraídos a partir de levedura	

residual cervejeira *S. cerevisiae* (PRC) e basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) Florianópolis, 2015.....66

Capítulo 3

Tabela 3.1 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* nas cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou polissacarídeos (1,5 mg/mL) extraído de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII). Florianópolis, 2015.....98

Tabela 3.2 Índice SPAD das cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou polissacarídeos (1,5 mg/mL) de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) aos 2 e 4 dias após o tratamento - dat (A) ou após 2 e 6 dias da inoculação (correspondente a 6 e 10 dat) com *X. gardneri* (B).....100

Tabela 3.3 Fluorescência inicial (F₀), fluorescência máxima (F_m) e rendimento quântico do Fotossistema II (F_v/F_m) nas cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou polissacarídeos (1,5 mg/mL) extraído de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) aos 2 e 4 dat (dias após o tratamento) ou 2 e 6 dpi (dias após a inoculação) com *X. gardneri* (6 e 10 dat).....104

Tabela 3.4 Taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e transpiração ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de cultivares de tomateiro tratadas com água destilada (H₂O) ou polissacarídeos extraídos a partir de basidiocarpos residuais do cultivo de Shiitake (PSHII; 1,5 mg/mL), inoculadas (I) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri* (D.O. 0.6; 600 nm). Dados coletados quatro dias após o tratamento (4 dat) ou dois dias após a inoculação (2 dpi) com *X. gardneri* (equivalente a 6 dat).....106

Tabela 3.5 Densidade estomática (número de estômatos/0,10005 mm²), espessura média do mesófilo (μm) e espessura de células do parênquima paliádico (μm) em folhas das cultivares Santa Cruz Kada e BRS Sena cultivadas em casa de vegetação em Florianópolis/SC.....108

Tabela 3.3.1. Valores médios de índice SPAD das cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) e polissacarídeos (1,5 mg/mL) de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) aos 2 e 6 dias após a inoculação (6 e 10 dias após o tratamento) com *X. gardneri*.....127

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 Colônias de *Xanthomonas gardneri* observadas sob coloração Gram-negativa (A), em placas de Petri (5 cm; Ø) após 48h de crescimento em meio de cultura nutriente-ágar (B) e sob microscopia eletrônica de varredura MEV (Jeol- JSM-6390LV; LCME/UFSC) da epiderme abaxial de tomateiro após 48h da inoculação (C). Folhas herbarizadas com sintomas da mancha bacteriana após 14 dias da inoculação (D).....31

Figura 1.2 Modelo Zig-Zag que ilustra o sistema de defesa vegetal. Figura retirada de Jones e Dangl (2006).....34

Capítulo 2

Figura 2.1 Esquema da obtenção dos polissacarídeos a partir de sólidos residuais à base de *S. cerevisiae* resultantes do processo cervejeiro, do substrato gasto após o cultivo de *P. ostreatus* e basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes*.....47

Figura 2.2 Esquema das condições nos ensaios de proteção de plantas de tomate em casa de vegetação (dpi: dias após inoculação).....53

Figura 2.3 Esquema ilustrativo das coletas de amostras vegetais no decorrer dos experimentos.....54

Figura 2.4 Espectros FTIR de polissacarídeos extraídos de resíduo cervejeiro (PRC), substrato de cultivo de *P. ostreatus* (PSPO) e basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII) em pastilhas de KBr.....59

Figura 2.5 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* nas cultivares de tomate BRS Sena, BRS Montese, BRS Nagai, Forfy, Gold, Laura, Coração de boi, Sta. Clara 5800, Sta. Cruz Kada, Carolina, Santy, Natália e Valerin. Os dados foram transformados para raiz quadrada (\sqrt{x}) e letras semelhantes não demonstram diferenças significativas entre as cultivares (ANOVA *one way*). Avaliação da severidade realizada 20 dias após inoculação. Florianópolis, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média.....65

Figura 2.6 Atividade de peroxidases (POD) e fenilalanina amônia liases (FAL) em folhas de diferentes cultivares de tomateiro (Santa Cruz Kada e Natália) tratadas com água ou polissacarídeos extraídos do cogumelo *L. edodes* (PSHII 1.5 mg/mL) e inoculadas (I) ou não (NI) com *X. gardneri* (D.O.0.6; 600nm). Valores médios das coletas realizadas aos 4 dias após o tratamento (4dat) e aos 7 dat (3 dias após a inoculação). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula entre cultivares; minúscula entre tratamentos, dentro da cultivar) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < .05$). *Efeito da inoculação em

relação aos respectivos controles não inoculados. Florianópolis, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média.....68

Figura 2.7 Compostos fenólicos totais (FENOL) e conteúdo de flavonóides (FLAVO) em folhas de diferentes cultivares de tomateiro (Santa Cruz Kada e Natália) tratadas com água ou polissacarídeos extraídos do cogumelo *L. edodes* (PSHII 1.5 mg/mL) e inoculadas (I) ou não (NI) com *X. gardneri* (D.O.0.6; 600 nm). Valores médios das coletas realizadas aos 4 dias após o tratamento (4dat) e aos 7 dat (3 dias após a inoculação). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula entre cultivares; minúscula entre tratamentos, dentro da cultivar) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < .05$). *Efeito da inoculação em relação aos respectivos controles não inoculados. Florianópolis, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média.....69

Capítulo 3

Figura 3.1 Secções transversais de folíolos de tomateiros das cultivares Santa Cruz Kada (1-14), Natália (15-28) e BRS Sena (29-42) após tratamento com água destilada ou polissacarídeos de basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII), seguidos de inoculação com *X. gardneri* e análise sob microscopia de óptica. Amostras foram coletadas nos tempos 0 (T0), 4 (T4), 7 (T7, equivalente a 3 dias após inoculação) ou 10 dias (T10) após aplicação de PSHII (6 dias após inoculação). Números ímpares demonstram secções coradas com azul de toluidina (ATO) que revela a presença de polissacarídeos ácidos e neutros e nesta as células apresentaram reação metacromática na parede celular. Secções representadas por números pares referem à coloração com ácido periódico de Shiff - PAS que demonstrando a presença de polissacarídeos neutros agregados nos amiloplastos e na parede celular. Adensamentos bacterianos indicados por estrelas nas imagens 11, 12, 39 e 40. Barras de 10 μ m.....109

Figura 3.2 Secções transversais de folíolos de tomateiros das cultivares Santa Cruz Kada (1-14), Natália (15-28) e BRS Sena (29-42) após tratamento com polissacarídeos de basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII), seguidos de inoculação com *X. gardneri* e análise sob microscopia de fluorescência. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 4, 7 (3 dias após inoculação) ou 10 dias após aplicação de PSHII (6 dias após inoculação). Imagens obtidas sob luz UV (números pares) ou luz azul (números ímpares). Setas indicam a presença de compostos fenólicos.....110

LISTA DE SIGLAS

ATO – Azul de toluidina

ASM – Acibenzolar-S-metil

BSA – Albumina de soro bovino

CBB – Azul Brilhante de Coomassie

D.O. – Densidade óptica

dat – dias após o tratamento

dpi – dias após a inoculação

EAG – Equivalente ácido gálico

EDTA – Etilenodiamino tetra-acético

EQ – Equivalente quercetina

FAL – Fenilalanina amônia-liase

FENOL – Compostos fenólicos

FLAVO – Flavonóides

HCl – Ácido clorídrico

NA – Nutriente ágar

PAS – Ácido periódico de Shiff

POD – Peroxidases

PRC – polissacarídeos de resíduo cervejeiro

PSPO – polissacarídeos de substrato após o cultivo de *P. ostreatus*

PSHII – – polissacarídeos de basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes*

PVP – Polivinilpirrolidona

SAR – Resistência sistêmica adquirida

UFCs – Unidades formadoras de colônias

ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1 ORIGEM BOTÂNICA DO TOMATE E SEU CULTIVO	25
3.2 MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO	27
3.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	32
3.4 PRODUTOS POTENCIALMENTE ELICITORES.....	36
4 CAPÍTULO 2 - POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE RESÍDUOS FÚNGICOS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO	41
4.1 RESUMO	41
4.2 INTRODUÇÃO.....	42
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.3.1 <i>Obtenção, manutenção e multiplicação do patógeno</i>	44
4.3.2 <i>Obtenção dos extratos brutos</i>	45
4.3.3 <i>Obtenção das frações polissacarídicas</i>	46
4.3.4 <i>Caracterização dos polissacarídeos</i>	47
4.3.5 <i>Efeito de polissacarídeos sobre o patógeno</i>	49
4.3.6 <i>Bioensaios em casa de vegetação e sala de crescimento</i>	50
4.3.7 <i>Proteção de plantas de tomate da cv. Kada em casa de vegetação</i>	50
4.3.8 <i>Proteção e resistência genética de tomateiros contra a mancha bacteriana</i>	52
4.3.9 <i>Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa</i>	53
4.3.10 <i>Análises estatísticas</i>	56
4.4 RESULTADOS.....	56
4.4.1 <i>Caracterização dos polissacarídeos</i>	56
4.4.2 <i>Efeito inibitório dos polissacarídeos sobre o patógeno</i>	60
4.4.3 <i>Bioensaios em casa de vegetação e sala de crescimento</i>	61
4.4.4 <i>Proteção de plantas de tomate da cv. Santa Cruz Kada em casa de vegetação</i>	62
4.4.5 <i>Proteção de cultivares de tomate com diferentes níveis de resistência à mancha bacteriana</i>	64
4.4.6 <i>Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa</i>	66

4.5 DISCUSSÃO	69
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
5 CAPÍTULO 3 - ASPECTOS FISIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DA RESISTÊNCIA INDUZIDA POR POLISSACARÍDEOS EM GENÓTIPOS DE TOMATEIRO COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA	86
5.1 RESUMO	86
5.2 INTRODUÇÃO	87
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	91
5.3.1 <i>Preparo do extrato e obtenção dos polissacarídeos</i>	91
5.3.2 <i>Efeito de PSHII na interação tomateiro e X. gardneri</i>	92
a) <i>Resistência de cultivares a mancha-bacteriana</i>	92
b) <i>Parâmetros relacionados à fotossíntese</i>	93
b.1) <i>Índice SPAD e Fluorescência da clorofila</i>	93
b.2) <i>Fotossíntese, condutância estomática e transpiração</i>	94
5.3.3 <i>Aspectos histopatológicos</i>	94
a) <i>Preparo das amostras</i>	94
b) <i>Deteção de polissacarídeos ácidos e neutros</i>	95
c) <i>Deteção de compostos fenólicos in situ</i>	96
d) <i>Aspectos anatômicos</i>	96
5.3.4 <i>Análises estatísticas</i>	97
5.4 RESULTADOS	97
5.4.1 <i>Efeito de PSHII na interação tomateiro e X. gardneri</i>	97
a) <i>Resistência de cultivares a mancha-bacteriana</i>	97
b) <i>Parâmetros relacionados à fotossíntese</i>	98
b.1) <i>Índice SPAD e Fluorescência da clorofila</i>	99
b.2) <i>Fotossíntese, transpiração e condutância estomática</i>	102
5.4.2 <i>Aspectos histopatológicos</i>	107
5.5 DISCUSSÃO	111
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
6 CONCLUSÕES GERAIS	128
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
8 APÊNDICES	143

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicon* L.) é uma das mais expressivas no cenário agrícola mundial. O Brasil ocupa a oitava posição na produção mundial de tomates (FAOSTAT, 2013) e, na safra 2015, a produção nacional foi estimada em 4.145.553 toneladas (IBGE, 2016). O principal fator no aumento dos custos da produção de tomates é a necessidade de elevado número de aplicação de agrotóxicos, os quais podem ser perigosos tanto para o ambiente quanto para o homem (CARRER FILHO; ROMEIRO; GARCIA, 2008; GRIMM, 2010).

Uma das doenças de grande importância e muito comum no Brasil é a mancha bacteriana do tomateiro, formada por um complexo com até quatro espécies bacterianas (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans* e *Xanthomonas vesicatoria*) (QUEZADO-DUVAL, 2003; JONES et al., 2004; PONTES; OLIVEIRA; QUEZADO-DUVAL, 2010). Na doença provocada por *Xanthomonas gardneri*, os sintomas consistem em manchas marrons escuras circulares de formato irregular, com tamanho menor que 5 mm de diâmetro e, frequentemente, com halos cloróticos nas folhas e caules. São bactérias aeróbias, gram negativas e apresentam colônias amarelo pigmentadas (KIM et al., 2010).

A doença acima mencionada é de difícil controle através dos métodos tradicionais e o controle químico não é totalmente eficaz. O controle químico de doenças, apesar de representar uma solução eficiente para a agricultura (KIMATI, 1995), traz impactos negativos ao ambiente (BETTIOL; MORANDI, 2009). O uso generalizado de agrotóxicos pode ocasionar a seleção de isolados resistentes, contaminação do solo e lençol freático, poluição do ar, danos à saúde humana e ao ecossistema (PACUMBABA; BEYL; PACUMBABA JR., 1999; FIALHO, 2004).

Nos últimos anos foram apresentadas propostas alternativas aos agroquímicos, com a busca de produtos que controlem satisfatoriamente as doenças, tenham baixo impacto ambiental e baixa toxicidade aos seres vivos (ROMEIRO, 1999; BALBI-PENÑA et al., 2006). A indução de resistência para a proteção de plantas mostra-se como alternativa menos agressiva à saúde humana e ao equilíbrio de agroecossistemas (STADNIK; MARASCHIN, 2004). Alguns trabalhos já demonstraram a eficiência da indução de resistência durante a interação *X. gardneri* e tomateiro (COQUEIRO; DI PIERO, 2011; COQUEIRO; MARASCHIN; DI PIERO, 2011; JAIL et al., 2014; LUIZ et al., 2012, 2015).

O controle de doenças através de indução de resistência é um método que vem se revelando promissor (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2008). A resistência induzida define o processo ativo de resistência dependente de barreiras físicas e/ou químicas da planta hospedeira, ativado por agentes bióticos ou abióticos, os chamados agentes indutores. Entre os indutores bióticos, podemos citar patógenos ativos ou inativados, linhagens não patogênicas e metabólitos microbianos (DI PIERO, 2003).

A resistência induzida tem início com o reconhecimento do patógeno ou pelo contato a um indutor químico ou biológico, desencadeando uma cascata de eventos de transdução de sinais que resulta na ativação de genes na planta e consequentemente respostas de defesa. A indução de resistência está relacionada aos mecanismos de defesa pós-formados e envolve a ativação de mecanismos latentes nas plantas em resposta a tratamentos. Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa que se tornam ativos em resposta ao tratamento com agentes elicitores (químicos, naturais ou sintéticos) ou à infecção por patógenos (VANDERPLANK, 1968; CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995; PIETERSE; VAN LOON, 1999; STADNIK, 2000).

Este tipo de resistência adaptativa que pode ser expressa tanto localmente quanto sistemicamente, tem sido nomeado de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e Resistência Sistêmica Induzida (SIR). Por muito tempo SAR e SIR foram considerados fenômenos semelhantes, porém ultimamente foram levantadas diferenças relacionadas às formas através das quais esses mecanismos de resistência são induzidos. Ambas, SAR e SIR são ferramentas importantes no controle de doenças de plantas, efetivas contra um amplo espectro de patógenos de plantas e a ativação simultânea de SAR e SIR resulta em maiores níveis de proteção (VAN LOON et al., 1998; VAN WEES et al., 2000; AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

A SAR diferencia-se de SIR por serem reguladas por rotas metabólicas distintas. A SAR requer tanto um acúmulo local e sistêmico do composto ácido salicílico (importante intermediário nas vias de sinalização da defesa sistêmica), quanto à indução de conjunto de genes codificadores de proteínas relacionadas à patogenicidade. Proteínas PR com atividade antimicrobiana podem contribuir para a planta atingir o estado de SAR. Já SIR é frequentemente regulada por ácido jasmônico

(AJ) e vias de sinalização associadas com etileno (ET). A ativação de uma ou outra via (SAR ou SIR) depende do agente indutor e da relação entre a natureza do agente indutor e a via induzida. Grosso modo, SAR é induzida por agentes biotróficos, enquanto a SIR é induzida por agentes necrotróficos. No entanto esta grosseira generalização não reflete o caso das rizobactérias que não causam necrose, mas induzem a via do AJ e ET e não do AS. Estas vias ativam genes envolvidos nas respostas de resistência, que são comuns às respostas observadas em genótipos com resistência qualitativa (sem graus intermediários de resistência) ou quantitativa (distribuição contínua de graus de resistência). Portanto, a SAR é observada atualmente como uma resposta integrada da resistência de plantas a patógenos, seja esta qualitativa ou quantitativa (JONES; DANGL 2006, AMORIM, REZENDE & BERGAMIN FILHO, 2011). Assim, a ativação simultânea de diversos mecanismos de defesa, durante a expressão da resistência sistêmica adquirida (SAR), ressalta o potencial genético da planta sem alterações no genoma e permite que materiais de interesse agrônômico suscetíveis continuem a ser plantados no campo (DI PIERO, 2003).

Produtores de hortaliças confrontados com os desafios relacionados ao ataque de patógenos têm a oportunidade de usar fungos e leveduras como agentes de controle alternativo de pragas. Fungos podem ativar importantes mecanismos como a produção de enzimas hidrolíticas e antibióticos, competição por nutrientes e colonização de nicho, indução de mecanismos de defesa das plantas hospedeiras e interferência nos fatores de patogenicidade do patógeno (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

O excedente de muitas indústrias que utilizam práticas biotecnológicas para abastecer necessidades humanas de consumo termina em rica biomassa residual. As restrições de recursos levam a indústria a aumentar sua eficiência global, melhorando processos existentes e buscando novos usos para os resíduos (LIN et al., 2013). Estudos relatam utilizações desses materiais aplicáveis na alimentação humana e animal (LEIMER, 2007), absorção de poluentes (HAN et al., 2006), biofertilizantes (ABAT, 2006) e produção de energia (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

Diversos estudos fitopatológicos apontam resultados positivos sobre a utilização de fungos, caso do cogumelo shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (DI PIERO, 2003; SILVA et al., 2007; TOFFANO, 2010) e da levedura fermentativa *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen (PASCHOLATI, 1998; PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2005; WALTERS et al., 2005), aplicados no combate a

patógenos e na elicitação de mecanismos de defesa em plantas. Moléculas elicitoras estimulam respostas de defesa em plantas, resultando na síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas). Tais respostas ocorrem após a ligação de elicitores aos receptores normalmente localizados na superfície de células vegetais, promovendo uma via de transdução de sinal que irá levar a ativação de um ou mais mecanismos de defesa (DI PIERO; WULFF; PASCHOLATI, 2006).

Espécies do gênero *Pleurotus* vêm se destacando por apresentar crescimento relativamente fácil. Existe a possibilidade de cultivo em uma ampla variedade de resíduos agroindustriais e florestais constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, tais como palha de cereais, polpa, serragem, etc. A espécie *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer é reconhecida por possuir polissacarídeos associados à parede celular com propriedades medicinais, e secretar exopolissacarídeos para o meio de cultivo (HESS et al., 2006). Suas características revelam um potencial para investigação de moléculas elicitoras do mecanismo de defesa em plantas.

Além disso, na literatura, a ausência de trabalhos relacionados a indutores de resistência obtidos de biomassas fúngicas descartadas da produção de alimentos e destinadas ao controle alternativo da mancha bacteriana no tomateiro justifica a importância do presente estudo.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes frações polissacarídicas obtidas a partir de sólidos residuais à base de *S. cerevisiae*, resultantes do processo cervejeiro, do substrato após o cultivo de *P. ostreatus* e de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* no controle da mancha bacteriana no tomateiro. As investigações conduzidas nesta pesquisa abordaram os mecanismos de ação das frações polissacarídicas obtidas de resíduos, buscando metabólitos de origem sustentável para a proteção de genótipos de tomateiro com diferentes níveis de resistência à mancha bacteriana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar efeitos da aplicação de indutores biológicos obtidos a partir de biomassas descartadas da produção de cerveja e do cultivo de cogumelos na indução de resistência de tomateiros para o controle da mancha bacteriana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obter frações polissacarídicas extraídas a partir dos resíduos fúngicos à base de *S. cerevisiae*, *P. ostreatus* e *L. edodes*, a fim de utilizá-los no controle alternativo de *X. gardneri* no tomateiro;
- 2) Caracterizar as frações polissacarídicas utilizadas no controle alternativo de *X. gardneri* no tomateiro;
- 3) Avaliar a influência dos extratos e suas respectivas frações, sobre o crescimento *in vitro* de *X. gardneri*;
- 4) Analisar em diferentes genótipos de tomateiro as atividades de enzimas (peroxidases e fenilalanina amônia-liases) e compostos (fenólicos) relacionados à indução de resistência;
- 5) Realizar estudo histofisiológico nas folhas de genótipos com diferentes níveis de resistência, para a detecção das alterações celulares e histológicas em plantas de tomate tratadas com frações de polissacarídeos indutores de resistência, seguidos da inoculação com *X. gardneri*;

3 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ORIGEM BOTÂNICA DO TOMATE E SEU CULTIVO

O tomate teve origem no Novo Mundo e todos os seus parentes selvagens são nativos da região andina da América do Sul. Acessos de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* foram levados para a Europa no século 15, após chegar a um estágio avançado de cultivo no México (centro de domesticação). Na Europa, acreditava-se que o tomate era venenoso, no entanto, a seleção e o melhoramento genético, principalmente na Itália, resultaram no aumento da popularidade do tomate devido à sua aparência, gosto e valor nutricional. O tomate é a peça central genética da família Solanaceae, devido ao seu modesto tamanho de genoma diplóide e tolerância à endogamia (HARLAN, 1992; INTERNATIONAL SOLANACEAE GENOMICS PROJECT, 2004).

A família Solanaceae possui tamanho médio, com cerca de 99 gêneros e 3000 espécies. Quase metade das espécies pertence ao gênero hiperdiverso *Solanum*. A família é mais diversificada na região Neotropical, onde 21 desses gêneros são endêmicos. Os membros da família habitam uma grande variedade de *habitats*, desde desertos mais secos da costa oeste da América do Sul e do planalto tibetano, às florestas tropicais da Amazônia e sudeste da Ásia. A forma de vida na família é igualmente variada, desde pequenas ervas anuais a árvores do dossel (KNAPP, 2010).

O gênero *Solanum*, com cerca de 1.500 espécies, é um dos maiores gêneros das angiospermas e inclui espécies economicamente importantes como o tomate, a batata e a berinjela. Em parte devido ao seu grande tamanho e centro de diversidade tropical, tem sido um desafio resolver relações evolutivas em todo o gênero *Solanum* (WEESE; BOHS, 2007). As comparações entre os genomas de tomate e outras plantas já sequenciadas como *Arabidopsis* e *Vitis* suportam a hipótese de que uma triplicação de todo o genoma que afeta a linhagem das rosídeas ocorreu em um ancestral comum, e sugere que uma poliploidização na linhagem das solanáceas precedeu a divergência das rosídeas – asterídeas. O projeto de sequenciamento do genoma do tomateiro envolveu mais de 14 países e permitiu ver onde estão os genes, quais

cromossomos e suas ações. Foram sequenciados cerca de 35.000 genes e juntamente as sequências desvendadas foi apresentada a similaridade entre os genomas de solanáceas, na procura por conhecimentos para a melhoria da produção, nutrição, resistência à doenças, sabor e coloração, inclusive de outros cultivos (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012).

O tomate *Solanum lycopersicon* L. é um dos frutos de hortícolas mais consumidos no mundo e a ingestão do fruto contribui para uma dieta saudável e equilibrada. Os frutos do tomateiro são ricos em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas. O tomate contém grandes quantidades de vitaminas B e C, ferro e fósforo (NAIKA et al., 2006). De acordo com a tabela brasileira de composição de alimentos (TACO, 2011), cada 100 g de tomate cru, com semente, possui um percentual 95% de umidade, 15(Kcal) de energia, 1,1 g de proteínas, 0,2 g de lipídeos, 3,1 g de carboidratos, 1,2 g de fibras alimentares, 7 mg de cálcio e 11 mg de magnésio.

O tomateiro pode se desenvolver de forma rasteira, semiereta ou ereta. O crescimento é limitado nas variedades de crescimento determinado e ilimitado nas de crescimento indeterminado, podendo neste caso chegar a 10 metros em um ano. As variedades de crescimento determinado são destinadas ao processamento industrial. Já as variedades de crescimento indeterminado se destinam à mesa do consumidor. As plantas se desenvolvem bem em um amplo espectro de latitude, tipos de solo, temperatura e métodos de cultivo. Ambiente quente, com boa iluminação e drenagem são os mais adequados para seu cultivo (ALVARENGA, 2004).

As variedades de tomate são reunidas em cinco grupos: grupo Santa Cruz, Salada, Cereja, Italiano (Saladete ou San Marzano) e grupo Agroindustrial. Nesta cultura são necessárias muitas adubações e o constante ataque de pragas exige elevado conhecimento para um cultivo eficiente. O plantio do tomate é recomendado conforme o local e a época do ano. Na região Sul do Brasil é indicado o plantio do tomate entre os meses de setembro e fevereiro. Na região Norte, o plantio ocorre entre os meses de março a julho. Nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, o plantio pode ser feito o ano todo. Regiões quentes e muito úmidas são problemáticas para a cultura, favorecendo a ocorrência de doenças (EMBRAPA/SEBRAE, 2010).

A região Sudeste destaca-se na produção brasileira de tomates com maior porcentagem de participação na safra de 2014. Entre os estados de grande influência na produção nacional estão São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Bahia, Ceará, Rio de Janeiro, Espírito

Santo e Santa Catarina (IBGE, 2014). O polo produtor de tomate em Santa Catarina se concentra na região do Alto Vale do Rio do Peixe. Os municípios de Caçador, Lebon Régis, Rio das Antas e Macieira, que compõem essa região, são responsáveis por 49,14% da área cultivada no Estado (COSTA et al., 2012).

3.2 MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

A mancha bacteriana do tomateiro foi inicialmente descrita por Ethel M. Doidge (1921) e denominada de cancro do tomateiro após ser encontrada no verão de 1914 em frutos de tomates disponíveis comercialmente na cidade sul-africana de Pretória. No mesmo ano, Gardner e Kendrick também identificaram uma bactéria causadora da mancha do tomateiro em Indiana nos EUA. Os autores observaram diferenças significativas quanto à atividade aminolítica entre as cepas isoladas por eles e a bactéria isolada por Doidge. No entanto, existiam poucas técnicas disponíveis para diferenciação de bactérias e ambos os organismos foram classificados como *Xanthomonas vesicatoria* e, posteriormente, como *X. campestris* pv. *vesicatoria* (JONES et al., 2004).

Na década de 90, Vauterin et al. (1990) e Stall et al. (1994) determinaram a existência de dois grupos com diferenças genéticas e fenotípicas dentro de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, chamando-os de grupo A e grupo B. Vauterin et al. (1995) reclassificaram *X. campestris* pv. *vesicatoria* e a conseqüente divisão em duas espécies. As estirpes B foram denominadas de *X. vesicatoria* e as cepas A como um patovar de *X. axonopodis*. Duas outras *Xanthomonas* foram isoladas a partir de tomateiros sintomáticos. A primeira foi isolada em 1957 por Sutic na Iugoslávia, inicialmente nomeada *Pseudomonas gardneri* e considerada sinônimo de *X. vesicatoria* por Dye em 1966. A segunda foi isolada na Flórida, nos Estados Unidos, no início de 1990 e as duas incluídas nos grupos adicionais C e D (JONES et al., 2004).

Com base em técnicas de hibridização de DNA, as estirpes do grupo C foram estreitamente relacionadas ao grupo A e colocadas dentro de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. As cepas do grupo D (identificadas por Sutic) geneticamente distintas de outras *Xanthomonas* associadas ao tomateiro tiveram a posição taxonômica confirmada após

análise na sequência de RNA ribossomal 16S, que indicou íntima relação filogenética com as *Xanthomonas* (JONES et al., 2004).

Atualmente, o gênero *Xanthomonas* consiste em 20 espécies que causam doenças em diferentes plantas hospedeiras de significância agrônoma e danos economicamente importantes. As doenças podem ocorrer de forma particularmente severa nas regiões de clima quente e úmido, porém, podem ocasionar grandes problemas em regiões temperadas. As *Xanthomonas* produzem um exopolissacarídeo (EPS) denominado goma xantana, amplamente utilizado como aditivo na indústria alimentícia, farmacêutica e de perfuração de óleo. Este EPS é importante na proteção das bactérias contra dessecação e atenua a dispersão pelo vento e chuva (MANSFIELD et al., 2012).

Trabalhos realizados com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) permitiram a identificação de genes envolvidos na biossíntese de xantana, como os genes *rpf*, que atuam na síntese de enzimas extracelulares e contribuem para fatores de virulência do patógeno. Os estudos demonstraram um sistema de sinalização célula-célula mediado por um ácido graxo *cis*-insaturado (DSF) percebido e sintetizado por genes *rpf* que são conservados em todas *Xanthomonas* (MANSFIELD et al., 2012).

Estudos com estas bactérias têm impactos científicos consideráveis. No trabalho de Gabriel et al. (1986) foi percebida pela primeira vez a hipótese do padrão de regulação gene a gene que governa as interações entre plantas e agentes patogênicos bacterianos. Boch e Bonas (2010) e Minsavage et al. (1990) estabeleceram a base genética do desencadeamento de resistência a doenças em pimenta, levando ao isolamento de genes que especificam a virulência em cultivares de pimenta contendo os genes de resistência à mancha bacteriana Bs1, Bs2 ou Bs3. AvrBs3 é o membro da grande família de proteínas efetoras TAL tipo III em *Xanthomonas* spp. Foi demonstrado que o efetor é translocado para o núcleo da célula vegetal, onde influencia a expressão do gene através da ligação aos promotores da planta. Este conhecimento oferece um grande potencial na área de biotecnologia agrícola, na engenharia de promotores que utiliza efetores TAL para dirigir a expressão de genes de resistência e permitir a edição de ligações específicas no DNA e gerar genótipos de design personalizado (MANSFIELD et al., 2012).

Entretanto, o relacionamento entre as atribuições das espécies de *Xanthomonas* e a gama de hospedeiros ou as raças para estas estirpes não é simples. Algumas cepas são patogênicas em tomate ou pimenta ou ambos. Outros gêneros da família Solanaceae já foram listados como

espécies hospedeiras. No entanto, os dados foram baseados principalmente de reações seguidas de inoculações, nas quais algumas podem ter apresentado hipersensibilidade ao contrário de reações compatíveis (HAMZA et al., 2010).

A mancha bacteriana possui importância mundial e tornou-se um grande problema em campos com plantio de tomateiros irrigados por aspersão. A doença apresenta o potencial de causar perdas substanciais devido à dispersão via sementes, a baixa eficiência de controle químico, e a falta de cultivares com resistência (QUEZADO-DUVAL et al., 2004). De acordo com Quezado-Duval et al. (2014) há um consenso de que a mancha bacteriana é um importante fator limitante da produção de tomates e a disponibilização de cultivares com resistência é extremamente desejável. No trabalho, os autores Quezado-Duval et al. (2014) indicaram sete híbridos (Heinz 9553, Heinz 9992, BRS Sena, XMX 7889, BQ 211, CVR54 e HF1-50) que experimentalmente apresentaram menores valores de severidade à mancha bacteriana. A cultivar BRS Sena, lançada pela EMBRAPA Hortaliças DF, foi primeiro híbrido nacional de tomate para processamento industrial com certa tolerância à mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* spp. (EMBRAPA, 2012).

Considerada uma das doenças mais destrutivas para a cultura, a mancha bacteriana provoca perdas severas tanto na parte destinada ao consumo *in natura* como para o processamento industrial. Na década de 50, no Estado de São Paulo, houve o primeiro relato da doença no Brasil (PONTES et al., 2010). Conforme Quezado-Duval et al. (2005), as quatro espécies de *Xanthomonas* que podem causar a mancha-bacteriana do tomateiro (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*) estão presentes no Brasil. Na região do Alto Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina, espécies de *Xanthomonas* foram isoladas em lavouras de tomate de mesa e determinadas por similaridades de perfis genômicos gerados por BOX-PCR. Entre os 44 isolados bacterianos, 80% foram identificados como *X. gardneri*, 11% como *X. perforans* e 9% como *X. vesicatoria* (COSTA et al., 2012).

A espécie *X. gardneri* (Figura 1.1) possui a característica de ser uma bactéria aeróbia, de cor amarelada, mucoide e gram-negativa. Os sintomas da mancha bacteriana consistem em manchas marrom escuras circulares de formato irregular, menores que 5 mm de diâmetro e, frequentemente, com halos cloróticos nas folhas e caules. Vários pontos

em um único folíolo podem coalescer, em parte ou na totalidade do folíolo, que pode se tornar amarelo ou morrer (KIM et al., 2010).

Os prejuízos causados por esta doença são devidos à redução da produtividade causada pela destruição foliar, com consequente perda de superfície fotossintetizante, e queda de flores e frutos em formação. Tradicionalmente, o controle químico da mancha-bacteriana tem sido feito com antibióticos e produtos à base de cobre. Atualmente, além dos cúpricos, apenas os princípios ativos acibenzolar-S-metil (ASM) e cloretos de benzalcônio possuem registro para a cultura no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento com indicação para o controle da mancha-bacteriana (AGROFIT, 2011; NASCIMENTO et al., 2013).

Medidas de controle tradicional para a mancha bacteriana incluem a aplicação de bactericidas, tal como hidróxido de cobre, em combinação com etileno-bis-ditiocarbamato (EBDC). A ineficácia dos agentes químicos convencionais, particularmente quando cepas do patógeno prevalentes são resistentes ao cobre, sugere a necessidade de abordagens alternativas ou complementares para a gestão da mancha-bacteriana (MOSS et al., 2007).

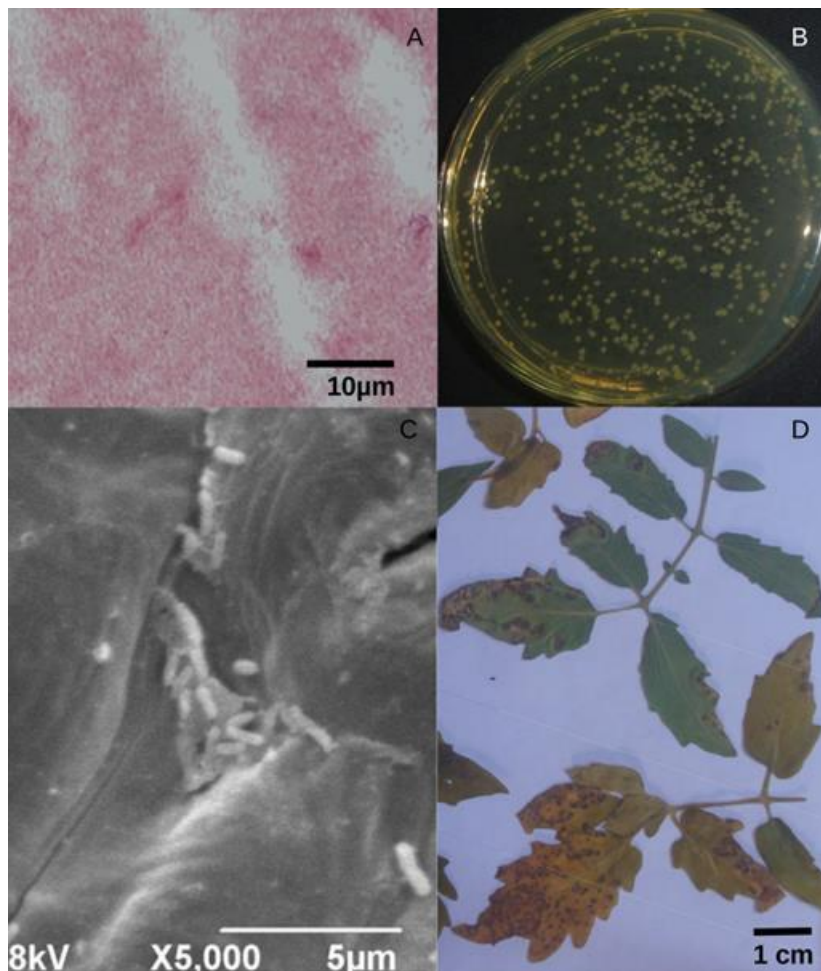


Figura 1.1 Colônias de *Xanthomonas gardneri* observadas sob coloração Gram-negativa (A), em placas de Petri (5 cm; Ø) após 48h de crescimento em meio de cultura nutriente-ágar (B) e sob microscopia eletrônica de varredura MEV (Jeol- JSM-6390LV; LCME/UFSC) da epiderme abaxial de tomateiro após 48h da inoculação (C). Folhas herbarizadas com sintomas da mancha bacteriana após 14 dias da inoculação (D).

3.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Em Fitopatologia, assume-se que a resistência de plantas é a regra e que a suscetibilidade é a exceção. A resistência pode ser entendida como a capacidade do hospedeiro evitar ou atrasar a penetração e subsequente desenvolvimento do patógeno (AGRIOS, 1997). O fenômeno de indução de resistência, comum na natureza, pode tornar as plantas mais resistentes à infecção de um patógeno por ativação prévia de seus mecanismos de defesa devido algum tipo de estresse. O estresse pode ser gerado por agentes indutores de origem biótica (patógenos avirulentos ou virulentos, como fungos, vírus, bactérias e extratos de plantas) ou abiótica (radiação UV, choque térmico, injúrias mecânicas ou compostos químicos tais como fosfatos, micronutrientes, aminoácidos e derivados do ácido salicílico) (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

No Brasil, entre os trabalhos pioneiros com indução de resistência pode ser citado o realizado por Moraes et al. (1976) com plantas de *Coffea arabica* suscetíveis à *Hemileia vastatrix* que foram submetidas a tratamento com uma suspensão de urediniosporos inativados pelo calor e que as protegeram contra um desafio subsequente com o mesmo patógeno. No entanto, o mecanismo de ação protetora era desconhecido.

A indução de resistência é atualmente descrita através de dois fenômenos biológicos, a resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (SIR). São fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes, no sentido de que após a exposição do indutor, os mecanismos de defesa da planta são ativados no sítio de indução e em outros locais distantes. Em SAR ocorre o acúmulo de PR-proteínas, e a via metabólica é salicilato dependente. Já para SIR não há o acúmulo PR-proteínas e sua indução parece associada à rota de sinalização de jasmonatos e etilenos (STADNIK; MARASCHIN, 2004; BONALDO et al., 2005). A indução de resistência sistêmica (SIR) é um mecanismo de biocontrole mediado pela planta no qual o agente de controle biológico e o patógeno não entram em contato um com o outro. Tanto em SAR como em SIR, a defesa das plantas hospedeiras é estimulada e a proteção ocorre de forma sistêmica (OWNLEY; WINDHAM, 2004).

Durante o processo de defesa da planta ao ataque de patógenos, podem ser ativadas as vias de sinalização envolvendo o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET). As vias de sinalização de AS e AJ são antagonísticas mútuas, já as vias de sinalização entre AJ e ET modulam uma a outra, e dados contraditórios refletem a complexidade

da sinalização cruzada entre o AS e as vias de sinalização do ET. Os patógenos que empregam estratégias envolvendo rapidamente a morte de células vegetais para obter nutrientes (necrotroficos) podem ativar respostas de defesa dependentes de AJ e ET. Patógenos que são geralmente controlados por respostas de defesa dependente de AS colonizam o apoplasto e multiplicam-se no tecido do hospedeiro durante vários dias antes de causar morte da célula vegetal e danos nos tecidos (KUNKEL; BROOKS, 2002).

Para Jones e Dangl (2006), o sistema de defesa da planta pode ser dividido em dois ramos. Um utiliza as vias de sinalização através de receptores transmembrana de reconhecimento de padrões (PRRs) que respondem a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O segundo atua largamente no interior da célula, utilizando produtos proteicos polimórficos (NB-LRR) codificados pela maioria dos genes R. Estes produtos proteicos são nomeados após a sua ligação ao nucleotídeo (NB) característico e pela presença de domínios ricos em leucina repetidos (LRR). A resistência a doenças mediada por NB-LRR é eficaz contra patógenos biotróficos ou hemibiotróficos, mas não contra os agentes patogênicos necrotroficos (JONES e DANGL, 2006).

Os autores mencionados acima apresentaram um modelo "zigzag" (Figura 1.2) que pode ser dividido em quatro fases para representação do sistema de defesa da planta. Na fase 1, os PAMPs são reconhecidos por PRRs, resultando em imunidade desencadeada ou disparada por PAMP chamada de PTI, que pode deter colonizações futuras. Na fase 2, os patógenos bem sucedidos implantam efetores que contribuem com a virulência do patógeno. Os efetores podem interferir com PTI. Isso resulta em susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na fase 3, um dado efector é especificamente reconhecido por uma das proteínas NB-LRR, e a imunidade efectora ETI é acionada. O reconhecimento é tanto indireto como por meio do reconhecimento direto de um efector NB-LRR. A ETI é uma resposta acelerada e amplificada de PTI, resultando na resistência à doença e, geralmente, uma morte celular por reação de hipersensibilidade (RH) no local da infecção. Na fase 4, a seleção natural aciona os patógenos para evitar ETI seja por diversificação do gene efector reconhecido, ou através da aquisição de efetores adicionais que suprimem ETI (JONES e DANGL, 2006).

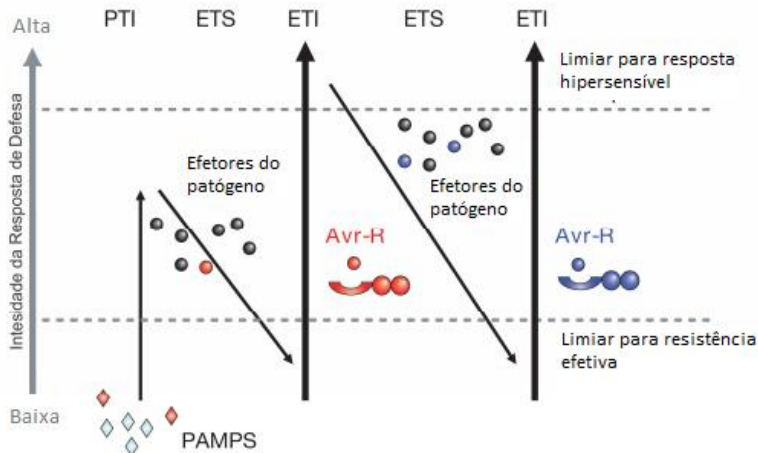


Figura 1.2 Modelo Zig-Zag que ilustra o sistema de defesa vegetal. Figura retirada de Jones e Dangl (2006).

Referente aos mecanismos de resistência para suprimir o ataque de patógenos, estes podem ser tanto pré-existentes quanto induzidos. Os pré-formados podem ser estruturais como a presença de cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores; ou ainda bioquímicos representados por fenóis, inibidores proteicos, quitinases e β -1,3 glucanases. Entre os mecanismos pós-formados estão classificados como estruturais as papilas, acúmulo de lignina, hidroxiprolina, glicina, camadas de cortiça e tiloses. Já entre os mecanismos bioquímicos pós-formados pode ser incluída a síntese de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, fitotoxinas e espécies ativas de oxigênio (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Normalmente a resistência tem início pelo mecanismo da reação de hipersensibilidade (RH) devido à incompatibilidade entre a planta portadora do gene de resistência dominante (R) e o patógeno contendo o gene dominante de avirulência (*Avr*). Com o reconhecimento do elicitor do patógeno, a planta libera espécies ativas de oxigênio (EAOs), que por reações de oxidação geram o colapso das células localizadas na região de infecção. A partir do oxigênio molecular (O_2), podem ser produzidos os agentes de explosão oxidativa: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais de hidroxila livres (OH^\cdot). O superóxido pode ser produzido na planta via ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases (POD) da parede celular, lipoxigenases (LOX) e na transferência de elétrons da

mitocôndria/cloroplasto. O superóxido oxida moléculas orgânicas como o ascorbato, ou reduz metais como Fe^{3+} . O peróxido de hidrogênio celular surge da dismutação do superóxido catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O acúmulo de H_2O_2 pode depender das etapas consecutivas de redução do oxigênio molecular ao ânion superóxido seguido pela dismutação espontânea ou catalisada de O_2^- a H_2O_2 (RESENDE et al., 2003).

Na interação planta-patógeno, durante a fase de reconhecimento dos elicitores provenientes do patógeno, são gerados processos de defesa como produção de EAOs, aumento de antioxidantes, ação de lipoxigenases, a RH, produção de fitoalexinas, lignificação e SAR. Porém, mesmo que as EAOs ocorram no metabolismo celular, essas podem se tornar tóxicas à célula quando acumuladas. A fim de reduzir os prejuízos, a célula dispõe de mecanismos para detoxificação. Esses mecanismos de proteção, desenvolvidos durante o processo de evolução, servem para controlar os níveis dessas moléculas e anular a toxicidade. Moléculas antioxidantes, enzimas simples, e um sistema mais complexo de detoxificação, podem estar envolvidos na proteção celular contra EAOs acumuladas (RESENDE et al., 2003).

As defesas vegetais são um produto da evolução, pois os compostos que aumentam a adaptação reprodutiva das plantas, por agirem na defesa contra fitopatógenos, podem também torná-los indesejáveis como alimento humano. Muitas plantas foram artificialmente selecionadas para produzir níveis relativamente baixos destes compostos e por consequência tornaram-se mais suscetíveis às moléstias (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As alterações metabólicas envolvidas com os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves do metabolismo primário e secundário. Entre estas está a enzima peroxidase (H_2O_2 oxireductase) que catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico na presença de H_2O_2 , dando origem à lignina. As peroxidases participam também da biossíntese de etileno, oxidação de compostos fenólicos e estão relacionadas com respostas de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas. Outra enzima intensamente estudada em plantas é a fenilalanina amônia-liase (FAL), que atua no metabolismo de compostos fenólicos. A FAL é responsável por desaminar a L-fenilalanina e gerar ácido *trans*-cinâmico e amônia. O

ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos compostos fenólicos que estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (STANGARLIN et al., 2011).

3.4 PRODUTOS POTENCIALMENTE ELICITORES

As leveduras são os micro-organismos unicelulares mais utilizados na indústria, cultivadas com a finalidade de se obter células, componentes celulares e produtos da fermentação alcoólica. Entre as leveduras mais conhecidas e comercialmente importantes estão linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (SERTKAYA, 2005). O fungo *S. cerevisiae* pertence ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetaceae (GOUVEA, 2007). *S. cerevisiae* é utilizado para fabricar pães, vinhos, cerveja, etanol e serve como modelo em muitos estudos biológicos. Foi o primeiro organismo eucariótico a ter seu genoma sequenciado, contém 16 cromossomos bem caracterizados e de fácil manipulação (SHERMAN, 2002). A parede da levedura consiste basicamente de manoproteínas, β -glucanas, e uma pequena quantidade de quitina. A composição da parede e a organização podem variar durante o crescimento e desenvolvimento (ORLEAN, 2012).

O Brasil é um produtor potencial de levedura residual obtida a partir de destilarias de álcool de cana de açúcar e também de cervejarias. A produção brasileira em 2013 foi cerca de 13 bilhões de litros de cerveja (a partir de cevada) e foi considerada entre os cinco países com as maiores produções do mundo (FAOSTAT, 2013). Para cada mil litros de cerveja ou chope produzidos são utilizados cerca de 7 quilos de levedura para a fermentação. Após a fermentação e a maturação, um total de 15 quilos de levedura podem ser recolhidos e utilizados por até 6 vezes (Cardoso et al. 2015). Na indústria brasileira da cana de açúcar, as destilarias de álcool também operam com o reaproveitamento de células de levedura. Dependendo das condições do processo em que o álcool está sendo produzido, uma matéria-prima de 15-60 g de levedura (de matéria seca) por litro de álcool é produzida. Normalmente, de 10-25 g/L podem ser separado do processo, como um co-produto pronto para venda (LEINER, 2007).

A biomassa residual de levedura obtida de destilarias/cervejarias apresenta uso potencial na área agrícola. Na literatura muitos são os exemplos de sucesso de *S. cerevisiae* na proteção de plantas cujos

mecanismos prováveis de ação são antibiose, competição e a indução de resistência (GOUVEA, 2007).

Lee et al. (2009) purificaram e identificaram uma proteína recombinante de *S. cerevisiae* localizada no peroxissomo (denominada 3-cetoacil-CoA tiolase -ScFox3) e esta apresentou efeito antifúngico *in vitro* contra *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium moniliforme* Sheld. e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc..

O extrato da parede celular da levedura contém componentes que podem eliciar respostas de defesa, como quitina, oligômeros de N-acetilglicosamina, beta-1,3 glucanas, glicopeptídeos e ergosterol. Alguns trabalhos já mostraram o potencial de compostos elicitores de células da levedura *S. cerevisiae* na ativação de respostas de defesa contra fitopatógenos e no controle de doenças em plantas de milho, sorgo, eucalipto e maracujá (FIALHO, 2004; ZANARDO; PASCHOLATI; FIALHO, 2009).

Assim como os micro-organismos fúngicos unicelulares (leveduras) são candidatos a atuarem como elicitores de defesa vegetal, o potencial de macrofungos com corpos de frutificação (cogumelos) também é relatado. Os representantes dos filos Ascomicetos e Basidiomicetos são fungos que apresentam posições ecológicas diferentes (fungos saprofitos, endofíticos, patogênicos, ou simbióticos - micorrizas) e podem produzir polissacarídeos. Os polissacarídeos produzidos desempenham diferentes funções biológicas, atuam na proteção contra fatores de stress ambiental e na interação com outros organismos. Polissacarídeos de Ascomicetos e Basidiomicetos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, imunestimulantes, antitumorais e antimicrobianas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015).

O gênero *Pleurotus* compreende um grupo de cogumelos ligninolíticos com propriedades medicinais, aplicações biotecnológicas e ambientais importantes. A espécie *P. ostreatus* é a terceira mais cultivada para fins alimentares, e é considerada rica fonte de proteínas, fibras, carboidratos, vitaminas e minerais. *Pleurotus* spp. são promissores como cogumelos medicinais, exibindo propriedade antiviral, antitumoral, antibiótica, antibacteriana, atividade hipocolesterolêmica e imunomodulação hematológica. Muitas moléculas bioativas que foram isoladas a partir de diferentes fungos são polissacarídeos (COHEN, PERSKY e HADAR, 2002).

O cogumelo ostra, *Pleurotus ostreatus*, está entre as espécies de fungos que ocasionam a decomposição de madeira nos ecossistemas terrestres em todo o mundo e são amplamente colhidos e cultivados como fungos comestíveis (VILGALYS; SUN, 1994). Quanto às características taxonômicas, a espécie *P. ostreatus* está classificada dentro da divisão Eumycota, subdivisão Basidiomycotina, classe Hymenomycetes, ordem Agaricales, família Agaricaceae ou Pleurotaceae, e pertencente ao gênero *Pleurotus*. A morfologia dos basidiocarpos é carnosa de coloração branca ou creme, haste curta, cilíndrica, crescimento em conjunto, e geralmente umbricado (URBEN, 2004).

O cogumelo "shiitake" (*Lentinula edodes*) é um fungo basidiomiceto que pode ser cultivado em troncos de árvores (eucalipto, carvalho, mangueira e abacateiro), ou em substratos preparados pelo homem. (PICCININ; DI PIERO; PASCHOLATI, 2010). Naturalmente, o cogumelo shiitake é encontrado como decompositor de árvores mortas ou ainda em sementes de carvalho (*Quercus serratus*) na forma de simbiote (auxilia a germinação destas sementes). De origem asiática, o shiitake é conhecido há aproximadamente 1.000 anos na China. Foi introduzido no Brasil na década de oitenta e ocupa a segunda colocação entre os cogumelos mais produzidos e consumidos no país e no mundo ficando atrás apenas do champignon (PICCININ, 2000).

Durante séculos o cogumelo shiitake tem sido consumido e estudado pelo homem. É considerado um alimento bastante apreciado no mundo devido ao sabor e valor nutricional. Outro fator interessante quanto ao consumo do cogumelo shiitake, relaciona-se ao uso como produto medicinal. Existem indicações de uso do cogumelo shiitake para reduzir doenças, sendo conhecido pelos chineses como “elixir da vida” (PICCININ, 2000). Shiitake apresenta elevado valor nutricional e contém vários compostos bioativos, incluindo polissacáridos (β -glucanas, como a lentinana), antioxidantes, fibras dietéticas, ergosterol, vitamina B1, B2 e C, folatos, niacina e minerais (ANTMANN et al., 2008). Os compostos produzidos pelo cogumelo *Lentinula edodes* possuem muitas propriedades funcionais, incluindo o polissacarídeo solúvel em água chamado lentinana, com propriedades antitumoral, antiviral, antimicrobiano, hipocolesterolêmico e hipoglicemiante; além de possuir outros compostos sem evidências de serem altamente tóxicos ou apresentarem efeitos colaterais graves (HEARST et al., 2009).

O interesse na produção de cogumelos é crescente, pois estes organismos podem converter o enorme desperdício de biomassa lignocelulósica em alimento humano, além de serem capazes de

produzir notáveis produtos nutracêuticos e medicinais com benefícios múltiplos para a saúde. Estes produtos têm efeitos benéficos ao bem-estar humano como alimentos, tônico para a saúde, propriedades medicinais, alimentos para animais, fertilizantes, além de proteger e regenerar o meio ambiente. É esperado que o cultivo de cogumelos medicinais comestíveis continue a expandir, assim como o desenvolvimento de pesquisas sobre a produção sustentável de cogumelos e dos produtos derivados de cogumelos (CHANG, 1999).

No mundo, estima-se que exista cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos. Dentre as espécies de fungos, aproximadamente 14.000 produzem corpos de frutificação grandes o suficiente para serem considerados cogumelos. O mercado mundial da indústria de cogumelos em 2005 foi avaliado em mais de 45 bilhões de dólares. Em 2013, a produção mundial de cogumelos comestíveis foi de 10 milhões de toneladas e a China o país que liderou este cultivo (FAOSTAT, 2013). A indústria de cogumelos pode ser dividida em três categorias principais: cogumelos comestíveis, produtos de cogumelos medicinais e cogumelos selvagens (CHANG, 2006).

No Brasil e no mundo, as principais espécies de cogumelos comestíveis cultivados são *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), *Lentinula edodes* (shiitake) e espécies do gênero *Pleurotus* (particularmente *P. ostreatus*, o cogumelo ostra ou shimeji) (PICCININ, 2000; KALACĚ, 2016). O cultivo de cogumelos é uma atividade crescente e relativamente recente no Brasil (DIAS, 2010). Em 2006, a produção nacional de cogumelos atingiu aproximadamente 5.894 toneladas (IBGE, 2006). Outro cogumelo bastante cultivado nos últimos anos é o *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), que não apresenta uso culinário (sabor desagradável), entretanto, uso medicinal considerável. Dentre os cogumelos citados, os que apresentam maiores facilidades de cultivo são os cogumelos *L. edodes* (shiitake) e os do gênero *Pleurotus* (shimeji, hiratake, etc.) (PICCININ, 2000).

Em média são produzidos cerca de 5 quilos de substrato de cultivo residual para cada quilo de cogumelo produzido (WILLIAMS et al. 2001). No entanto, estes valores podem variar de acordo com a espécie de cogumelo produzida. No Brasil, talvez pela falta de pesquisa, a produtividade brasileira de *A. bisporus* em Mogi das Cruzes, principal região de cultivo do Estado de São Paulo e no país, é estimada na ordem de 5-7 kg de cogumelos frescos/100 kg de substrato úmido (4-6 kg de

cogumelos frescos/m²). Entretanto, na Europa a produtividade média do champignon é de 30 kg/100 kg de substrato (EIRA, 2000). Muitos dos resíduos gerados durante o cultivo de cogumelos poderiam ser aproveitados, valorizados e destinados a aplicações na área agrícola.

Um dos aspectos mais importantes de *Pleurotus* spp. está relacionado à variedade de aplicações de seu sistema ligninolítico para a bioconversão de resíduos agrícolas, produtos valiosos para a alimentação animal, utilização das enzimas ligninolíticas na biodegradação de organopoluentes, xenobióticos e contaminantes industriais (COHEN, PERSKY e HADAR, 2002; JORDAN; MULLEN, 2007). Os efeitos benéficos do substrato residual do cultivo de cogumelos, utilizado no solo, para dissipação de fungicidas de diferentes classes e o patógeno *Plasmodiophora brassicae*, foram relatados pelos autores Marín-Benito et al. (2012) e Fayolle et al. (2006) respectivamente.

Nas últimas décadas, foram realizados trabalhos utilizando extratos aquosos dos substratos residuais do cultivo de cogumelos para o controle de doenças foliares. O potencial dos resíduos dos cultivos de *Agaricus bisporus* (Lange) e *Lyophyllum decastes* Sing. foi estudado no controle da sarna da macieira em campo, combate ao oídio, mancha angular e antracnose do pepino. O extrato aquoso do substrato de *A. bisporus* reduziu significativamente a área foliar afetada pela sarna da macieira em relação à testemunha no trabalho realizado em campo (YOHALEM; NORDHEIM; ANDREWS, 1996). Plantas de pepino tratadas com pulverização de extrato aquoso autoclavado do substrato de *L. decastes* e *Pleurotus eryngii* (DC.) Qué., apresentaram redução significativa nos sintomas das doenças causadas pelos patógenos *Podosphaera xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish., *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* Smith & Bryan e *Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx (PARADA et al., 2012).

Outros trabalhos na área agrícola também demonstraram ser possível o controle de fitopatógenos com a utilização do cogumelo comestível *Lentinula edodes* (Berk.) (DI PIERO, 2003; TONUCCI, 2004; SILVA et al., 2007; TOFFANO, 2010). Em estudo anterior, os autores Pacumbaba, Beyl e Pacumbaba Jr. (1999) relataram que extratos de basidiocarpos e do micélio de Shiitake apresentam importantes propriedades medicinais, e resultados comprovaram o efeito antibiótico sobre microrganismos patogênicos ao homem (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, e *Staphylococcus aureus*) e plantas (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *X. campestris* pv. *glycines*, *Erwinia amylovora*,

X. campestris pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum*, e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*). Silva et al. (2007) afirmam que o cogumelo *Agaricus blazei* Murrill também apresenta substâncias no basidiocarpo e no micélio com potencial para o controle de fitopatógenos, que podem ativar mecanismos de defesa da planta. Os potenciais dos extratos de basidiocarpos dos cogumelos *Ganoderma* sp. e *Oudemansiella canarii* na indução de resistência sistêmica em plantas de pepino contra o oídio (*Podosphaera xanthii*) foram relatados nos trabalhos de Stadnik e Bettiol (2001, 2007).

4 CAPÍTULO 2 – POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE RESÍDUOS FÚNGICOS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

4.1 RESUMO

Polissacarídeos fúngicos foram avaliados contra a mancha foliar do tomateiro causada por *Xanthomonas gardneri*. Frações polissacarídicas foram extraídas de biomassas residuais do cultivo de cogumelos e de levedura de cervejaria. Os polissacarídeos foram parcialmente caracterizados, avaliou-se o efeito *in vitro* (direto) sobre o patógeno e o efeito *in vivo*. *In vitro*, o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi avaliado após o contato direto (0, 2, 4 e 6 horas) entre as suspensões polissacarídicas (0, 0.25, 0.75 e 2.25 mg/mL) e a suspensão bacteriana. Estudou-se também o modo de ação dos polissacarídeos sobre tomateiros em diferentes condições, estádios fenológicos e cultivares. Mudanças de tomateiros Santa Cruz Kada foram tratadas com polissacarídeos (1,5 mg/mL) em experimentos conduzidos em casa de vegetação e sala de crescimento. Igualmente em tomateiros suscetíveis contendo 5 folhas definitivas, avaliou-se o efeito do intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação (4 ou 7 dias) e concentrações dos polissacarídeos (0,5 ou 1,5 mg/mL). Posteriormente, foram conduzidos ensaios de resistência e proteção de genótipos. *In vitro*, apenas os polissacarídeos de *L. edodes* apresentaram indícios de ação direta sobre o patógeno devido aos seus altos teores de compostos fenólicos e ao potencial antioxidante. *In vivo*, os polissacarídeos de *L.*

edodes apresentaram maior eficácia na redução da severidade (%) da mancha bacteriana em cotilédones (51,5%), em plantas no início do crescimento vegetativo (49,1%) e no estágio de cinco folhas definitivas (50,6%). Com o uso de polissacarídeos de *S. cerevisiae* as reduções obtidas foram de 48,4% em cotilédones; 30,2% em plantas jovens e 46,8% em plantas com cinco folhas. No caso dos polissacarídeos de substrato de *P. ostreatus* as porcentagens de controle chegaram a 48,4%; 33,4% e 45,5% nos respectivos estádios. Além disso, polissacarídeos de *S. cerevisiae* e *L. edodes* diminuíram a severidade da doença nas cultivares Santa Cruz Kada, Natália, BRS Sena, e Forty. BRS Sena apresentou os menores valores de severidade da doença independente do tratamento aplicado. Polissacarídeos de *L. edodes*, eficientes contra a mancha bacteriana, não alteraram a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase ou teor de flavonóides em tomateiros suscetíveis. Contudo, o tratamento com polissacarídeos de *L. edodes* aumentou a atividade de peroxidases e o conteúdo de fenóis totais em plantas da cv. Santa Cruz Kada. Portanto, polissacarídeos obtidos a partir de resíduos da indústria alimentar conferem proteção contra a mancha bacteriana em cultivares de tomateiro, possivelmente por induzir mecanismos de defesa da planta e apresentam potencial para geração de produtos utilizados no controle fitossanitário.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, indução de resistência; *Xanthomonas gardneri*; *Pleurotus ostreatus*; *Lentinula edodes*.

4.2 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicon* L.) é o oitavo vegetal mais cultivado em todo o mundo, com produção agrícola significativa em muitos países (FAOSTAT, 2013). Os agroquímicos usados para controlar patógenos de plantas não só aumentam os custos da produção (CARRER FILHO et al., 2008), bem como podem contaminar o solo e águas subterrâneas, causar potencial danos à saúde humana e do ecossistema, e, eventualmente, levar à seleção de patógenos resistentes (PACUMBABA et al., 1999).

A mancha bacteriana é uma doença causada por espécies de bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, que ocasionam sintomas severos nas regiões de clima quente e úmido, também capazes de gerar grandes problemas em regiões temperadas (MANSFIELD et al., 2012). Campos de tomate irrigados por aspersão proporcionam

condições favoráveis para a dispersão da doença. Além disso, a doença tem potencial de causar danos substanciais às culturas devido à dispersão via sementes, baixa eficiência de controle químico, e ausência de cultivares resistentes (QUEZADO-DUVAL et al., 2004). No Brasil, dentre as espécies associadas à mancha bacteriana do tomateiro, a espécie prevalecente nos campos de produção é *X. gardneri* (QUEZADO-DUVAL et al., 2015). Na região produtora de tomates localizada no Alto Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina, Brasil, quase 80% dos isolados de *Xanthomonas* causadores da mancha bacteriana do tomateiro foram identificados como *X. gardneri*, 11% como *X. perforans* e 9% como *X. vesicatoria*, usando a técnica BOX-PCR (COSTA et al., 2012).

Alguns fungos podem combater agentes patogênicos através da secreção de enzimas, tais como quitinases, ou antibióticos, e pela competição por nutrientes, auxiliando no manejo de doenças. Nesse sentido, podem ainda atuar como indutores de resistência, estimulando a síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PUNJA e UTKHEDE, 2003). O reconhecimento de elicitores fúngicos ocorre após a ligação com proteínas receptoras na parede da célula da planta, que ativam mecanismos de defesa contribuindo para a resistência sistêmica geral da planta (DI PIERO et al., 2006).

Extratos de fungos, incluindo os obtidos de biomassa residual, apresentam potencial para o controle alternativo de doenças em plantas. O extrato do substrato de *Agaricus bisporus* reduziu a área foliar afetada pela sarna da macieira em condições de campo (YOHALEM et al., 1996). Plantas de pepino pulverizadas com extrato do substrato de *Lyophyllum decastes* e *Pleurotus eryngii* apresentaram redução nos sintomas causados pelos patógenos *Podosphaera xanthii*, *P. syringae* pv. *lachrymans* e *Colletotrichum orbiculare* (PARADA et al., 2012). O cogumelo Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) tem também apresentado papel importante no controle dos fitopatógenos *Colletotrichum lagenarium*, *Passion fruit woodiness virus* e *Xanthomonas vesicatoria* (DI PIERO, 2003); *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Tobacco mosaic virus* (TONUCCI, 2004); *Ralstonia solanacearum* (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007; PACUMBABA; BEYL; PACUMBABA JR, 1999), *Guignardia citricarpa* (TOFFANO, 2010) e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (PACUMBABA; BEYL;

PACUMBABA JR, 1999). Recentemente, o uso do extrato da parede celular de levedura de cervejaria pôde suprimir a murcha por *Fusarium* em espinafre, a pinta bacteriana em *Arabidopsis* e a antracnose do pepino (MARIAN et al., 2014).

Atualmente, a necessidade de se encontrar medidas para o controle de doenças vegetais com menor impacto ambiental pode ser associada à oportunidade de destino mais nobre aos biomateriais residuais. As quantidades de biomassas anualmente geradas no mundo a partir das indústrias cervejeira e de cultivo de cogumelos giram em torno de 3 bilhões de toneladas de levedura residual (FAOSTAT, 2013; CARDOSO *et al.*, 2015) e 50 milhões de toneladas de substrato de cultivo de cogumelos (FAOSTAT, 2013; WILLIAMS; MCMULLAN; MCCAHEY, 2001). Biomassas que apresentam potencial para extração de subprodutos, como por exemplo, os polissacarídeos. Polissacarídeos têm ação reconhecida na agricultura devido à ativação de respostas de defesa em plantas e conseqüente redução nos sintomas de fitopatógenos. Além do efeito bioprotetor em plantas, polissacarídeos extraídos da parede celular de fungos também demonstram potencial agrícola e ambiental para biofertilização e biorremediação do solo/água (OSÍNSKA-JAROSZUK et al., 2015).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes polissacarídeos obtidos a partir de resíduos de *S. cerevisiae*, substrato de cultivo de *P. ostreatus* e basidiocarpos de *L. edodes* para controlar a mancha bacteriana do tomateiro. Os modos de ação dos polissacarídeos sobre plantas de diferentes genótipos de tomateiro também foram abordados neste trabalho.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Obtenção, manutenção e multiplicação do patógeno

O isolado de *Xanthomonas gardneri* (Xan 166 - Grupo D) proveniente de Águas Mornas-SC, foi obtido de folhas sintomáticas de tomateiro cultivar Carmen, cedido pela Empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA e identificado através de BOX-PCR pela pesquisadora Alice Maria Quezado-Duval da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF) (COQUEIRO e DI PIERO, 2011).

A bactéria foi mantida em tampão fosfato (8.6 mM K_2HPO_4 ; 7.4 mM KH_2PO_4) a 25 °C (COQUEIRO e DI PIERO, 2011). Para a

multiplicação foi realizada repicagem em meio nutriente ágar (NA, 28 g/L, HIMEDIA®) e as placas de Petri incubadas em estufa no escuro a 25 °C, durante 48 horas.

Posteriormente, a suspensão bacteriana foi obtida por adição de água destilada ao meio de crescimento de colônias, com auxílio da alça de Drigalsky. No final, a concentração da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (U-1800 spectrophotometer) a 600 nm (LUIZ et al., 2015). Nos experimentos *in vitro*, o valor de densidade ótica (D.O.) da suspensão foi ajustado para 0,2 D.O.; utilizou-se 0,3 D.O. e 0,6 D.O. nos testes realizados em plantas com a presença de 5 folhas definitivas.

4.3.2 Obtenção dos extratos brutos

O substrato residual de produção de *Pleurotus ostreatus* (SPO), após a segunda colheita dos corpos de frutificação (após 4 meses de cultivo), foi disponibilizado pela empresa Cogumelos da Gula, localizada no Município de Garopaba, SC. O substrato era composto de 2,5 kg da mistura de palha de arroz (99%) e cal (1%) e posteriormente foi depositado em bolsas plásticas de polipropileno, seguidas de tratamento térmico. Após o resfriamento, foi inoculado com 25 g de sementes de trigo colonizadas pelo fungo e incubado em sala escura com controle de temperatura e umidade relativa. Após 30 dias do crescimento vegetativo (colonização completa do substrato), o substrato foi transferido para casa de vegetação, onde permaneceu 70 dias sob condições ideais para o desenvolvimento dos cogumelos.

O SPO foi desagregado com a mão, pesou-se a quantidade de 500g e foi adicionado 1,5 L de água destilada (1:3, substrato/água). O conteúdo passou por autoclavagem de 30 minutos a 121 °C e, após o resfriamento, foi filtrado em dupla camada de gaze esterilizada, obtendo-se o extrato aquoso bruto ESPO (PARADA et al., 2012).

Os basidiocarpos residuais da produção de *Lentinula edodes* (cogumelos Shiitake defeituosos e desuniformes; considerados de baixa aceitação para o mercado consumidor *in natura*) foram fornecidos pelo Dr. Márcio José Rossi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Santa Catarina Universidade Federal, Brasil). Os cogumelos foram fatiados e utilizados na mesma proporção, condições de autoclavagem e

filtragem, anteriormente descritas para ESPO, resultando no extrato aquoso bruto de basidiocarpos residuais de *L. edodes* (ESHII).

O resíduo da indústria cervejeira (RC) foi constituído de uma suspensão densa de células da levedura *S. cerevisiae*, recolhida após o processo de fermentação. Este resíduo foi cedido pela Cervejaria Artesanal Amanita, localizada em Rancho Queimado, SC. Ele passou por centrifugação a 7.500 rpm durante 5 minutos a 25 °C, a fim de sedimentar as células de levedura. O precipitado foi distribuído sobre placas plásticas de polipropileno e submetido à secagem em estufa a 60 °C por cerca de 3 dias. O RC seco passou por trituração em moinho analítico e foi armazenado em freezer a -20°C.

Na preparação do extrato aquoso do resíduo da indústria cervejeira (ERC), foi utilizada a proporção descrita por Hahn e Albersheim (1978), ou seja, 200 g do resíduo RC seco em 1L de água destilada. A suspensão resultante foi mantida por 3 minutos em agitação em ultra turrax (modelo T 18 basic -IKA®) a 3600 rpm. O tempo de autoclavagem adotado foi de 2 h a 121°C (ZANARDO et al., 2009). A suspensão resultante passou por resfriamento e centrifugação a 7500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi considerado o extrato aquoso bruto (ERC).

4.3.3 Obtenção das frações polissacarídicas

Para a obtenção das frações de polissacarídeos totais (PRC, PSPO ou PSHII), os extratos aquosos brutos foram submetidos à precipitação etanólica (80%) na proporção etanol:extrato 1:1 (v/v) (HAHN e ALBERSHEIM, 1978), por um período de 24 h, a -20 °C (PAULERT et al., 2009). Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e as frações de polissacarídeos totais passaram por secagem em estufa a 45 °C por aproximadamente 3 dias. Ao atingir um peso constante, foram triturados em moinho analítico, e armazenados em freezer a -20 °C (Figura 2.1).

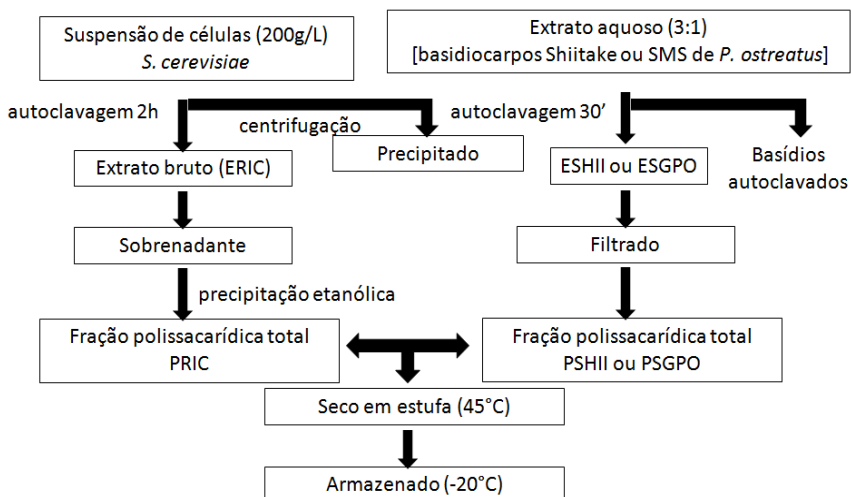


Figura 2.1 Esquema da obtenção dos polissacarídeos a partir de sólidos residuais à base de *S. cerevisiae* resultantes do processo cervejeiro, do substrato de cultivo de *P. ostreatus* e basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes*.

4.3.4 Caracterização dos polissacarídeos

As frações de polissacarídeos extraídas a partir de resíduo cervejeiro (PRC), do substrato de cultivo de *P. ostreatus* (PSPO) e dos basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII) foram caracterizadas quanto ao teor de proteínas, carboidratos totais, potencial Zeta, pH, condutividade, compostos fenólicos, potencial antioxidante e espectroscopia de infravermelho tipo IV.

a) *Determinação do teor de carboidratos.* Os teores de carboidratos totais das frações de polissacarídeos PRC, PSPO e PSHII foram analisados pelo método do fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956), adaptado por Masuko et al. (2005) para leitor de microplacas. As frações de polissacarídeos foram diluídas em água destilada a uma concentração de 1,5 mg/mL. Em tubos de 1,5 mL foram adicionados 50 µL de cada amostra, 150 µL de ácido sulfúrico (PA) e 30 µL de fenol a 5%. A mistura foi incubada durante 5 minutos a 90 °C em banho de

água. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de água à temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, os conteúdos dos tubos foram transferidos para microplacas (TPP 92096 - Tissue Culture Testplate 96F, Switzerland) e medida a absorvância a 490 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices; SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform, Austria). O teor total de carboidratos de cada amostra foi calculado utilizando uma curva padrão de glicose de 0 a 5 mg/mL ($y = 0,288x + 0,055$, $R^2 = 0,989$) e expressa em mg de glicose.

b) *Determinação do teor de proteínas.* O conteúdo total de proteínas de cada fração dos polissacarídeos (PRC, PSPO e PSHII) foi determinado empregando-se o método de Bradford (1976). Para tal, foram adicionados 60 µL de reagente concentrado de Bradford a 240 µL da suspensão de polissacarídeos (3 mg/mL). Após 10 min, foi realizada a leitura de absorvância a 595 nm em leitor de microplaca (Spectramax®). A concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em µg de albumina de soro bovino (BSA), utilizando-se de curva padrão de concentrações de BSA variando de 0 a 60 µg/mL.

c) *Potencial Zeta.* As suspensões PRC, PSPO e PSHII (1,5 mg/mL) foram alocadas em célula capilar (modelo: DTS1070) e mensuradas (nove leituras por amostra) quanto aos valores de potencial zeta, intensidade de dispersão e condutividade em equipamento Zetasizer Nano ZS 90 Malvern UK.

d) *Compostos fenólicos.* O conteúdo de compostos fenólicos totais presentes nas suspensões de polissacarídeos (1,5 mg/mL) foi avaliado conforme metodologia utilizada por Popova et al. (2007), com algumas modificações. Uma alíquota de 3,2 mL de cada suspensão foi transferida para tubos de ensaio (em triplicata), contendo 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 600 µL de uma solução a 20 % de carbonato de sódio (w/v). A amostra foi incubada por 2 h no escuro e a absorvância medida a 760 nm. A concentração de compostos fenólicos totais de cada amostra foi expressa em ng de ácido gálico, utilizando-se de curva padrão de concentrações variando de 0 a 25 ng/mL ($y = 0.019+0.076x$; $R^2 = 0.993$). Para análise dos resultados, os dados foram transformados para $\log(x)$.

e) *Sequestro de radicais livres (DPPH).* A captura do radical livre DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil - Sigma) foi avaliada de acordo com metodologia adaptada de Wang et al. (2015). A reação foi obtida pela mistura de 1 mL de álcool etílico contendo DPPH 0,2 mM e 1 mL das suspensões dos polissacarídeos (1.5 mg/mL). A solução foi incubada a 25 °C durante 30 min no escuro, e posteriormente a

absorbância determinada a 517 nm. Etanol absoluto foi utilizado como branco da reação. A atividade antioxidante dos polissacarídeos foi avaliada de acordo com a seguinte fórmula: taxa de sequestro (%) = $[1 - (A_i - A_j / A_c) \times 100\%]$. Onde A_c é a absorbância de 1 mL de DPPH e 1 mL etanol absoluto, A_i e A_j representam a absorbância de 1 mL de amostra e 1 mL de DPPH ou etanol absoluto.

f) *Análise espectral em infravermelho*. Espectros FTIR para as frações totais de polissacarídeos (PRC, PSPO e PSHII) foram determinados em aparelho de espectroscopia de infravermelho (Agilent Technologies - Series FTIR Spectrometer Cary 600) junto a Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC. Os polissacarídeos foram misturados com KBr em pó, moídos e prensados em peletes (1 mm) para medições FTIR no intervalo de frequência entre $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ (WANG et al., 2015).

4.3.5 Efeito de polissacarídeos sobre o patógeno

O efeito dos polissacarídeos sobre o crescimento *X. gardneri* foi avaliado através de ensaios *in vitro* pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Polissacarídeos, preparados conforme descrito acima, foram autoclavados e utilizados na concentração final de 0, 0,25, 0,75 ou 2,25 mg/mL. As soluções de polissacarídeos e a diluição (10^{-5}) de suspensão bacteriana de *X. gardneri* (D.O. 0,2; 600 nm) foram adicionados em quantidades iguais (150 μL) em tubos de ensaio pré-esterilizados (três repetições por concentração). Depois de misturar delicadamente, o conteúdo dos tubos foi pipetado imediatamente (0 h) ou incubado por 2, 4 e 6 horas sob condição de crescimento escuro, a 25°C . Alíquotas de 50 μL (em duplicata por tubo) foram espalhadas em placas de Petri (5 cm, \emptyset) contendo meio de ágar nutriente (NA, 28 g/L) sendo realizadas seis repetições por tratamento. O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi analisado após 48 horas. Foram realizados quatro repetições por tratamento.

4.3.6 Bioensaios em casa de vegetação e sala de crescimento

Inicialmente, a eficiência dos polissacarídeos para o controle da mancha bacteriana foi avaliada em mudas de tomateiro suscetíveis da cultivar Santa Cruz Kada (Paulista). Nos bioensaios realizados em casa de vegetação, as plantas foram cultivadas em bandejas de isopor contendo o substrato Tropstrato HT Hortaliças® sob temperatura média de $24 \pm 3^\circ\text{C}$. Já para os bioensaios em sala de crescimento foram utilizadas bandejas plásticas (20 cm/ 10 cm) contendo o mesmo substrato, porém mantidas sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h (sob luz fluorescente e uma densidade de fluxo de fótons de $160 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Quando as plantas apresentaram 8 cm de altura, foram pulverizadas com as frações polissacarídicas PRC, PSPO e PSHII na concentração 1,5 mg/mL. Após quatro dias dos tratamentos, as plantas foram inoculadas com *X. gardneri* (suspensão bacteriana a D.O. 0,3; 600 nm) com auxílio de pistola acoplada a compressor de ar. Foram realizadas quatro repetições por tratamento e cada repetição constituída por oito plantas. Os bioensaios em casa de vegetação foram avaliados aos 14 dias após a inoculação conforme o valor de severidade (%) alcançado por planta. Já nos conduzidos em sala de crescimento, foi analisada a severidade (%) por cotilédone 30 dias após a inoculação. A severidade foi calculada com auxílio do programa Quant (VALE et al. 2003) de acordo a área de tecido vegetal sintomático.

4.3.7 Proteção de plantas de tomate da cv. Kada em casa de vegetação

Subsequentemente, o efeito de polissacarídeos foi avaliado nos tomateiros suscetíveis em pleno desenvolvimento vegetativo. As sementes de tomate da variedade Santa Cruz Kada (Paulista) foram dispostas em bandejas de isopor contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças®. Quinze dias após a semeadura, duas plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 2 L com solo e substrato Tropstrato HT (4:1 v/v). A adubação por vaso consistiu em 20 mL da solução contendo 4,0 g de ureia e 4,0 mL de Eurofit ® por litro de água, realizada a cada 15 dias. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com temperaturas médias de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo médio de 12h no decorrer dos experimentos. No experimento com a cultivar Santa Cruz Kada, 15 mL das frações polissacarídicas PRC, PSPO e

PSHII nas concentrações 0,5 e 1,5 mg/mL foram aplicadas por planta quando estas apresentavam cinco folhas definitivas. As frações foram aspergidas na parte aérea com auxílio de pistola acoplada a um compressor de ar, 4 ou 7 dias anteriores à inoculação com *X. gardneri*. Água destilada foi utilizada como controle positivo. A concentração do inóculo de *X. gardneri* foi ajustada em espectrofotômetro para 0,6 valores de densidade ótica a 600 nm. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida durante 48 h. Foram realizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um vaso contendo duas plantas. A avaliação da severidade da doença foi realizada 20 dias após a inoculação das plantas utilizando escala diagramática da mancha bacteriana desenvolvida por Mello et al. (1997), composta por cinco níveis de área foliar necrosada (1%, 5%, 15%, 25% e 50%). Foram avaliadas duas folhas de cada planta (terceira e quarta folhas definitivas), totalizando quatro folhas por vaso (repetição).

Após verificar o efeito dos três tipos de polissacarídeos, a fração polissacarídica considerada mais promissora PSHII foi preparada nas concentrações 0,5; 1,5; e 4,5 mg/ml e estas aplicadas sobre plantas da cultivar Santa Cruz Kada. A aplicação de 15 mL de tratamento por planta aconteceu quando estas apresentaram cinco folhas, no quarto ou sétimo dias anteriores à inoculação com *X. gardneri*. Os tratamentos foram aspergidos na parte aérea com auxílio de pistola de pintura acoplada a um compressor de ar. Plantas aspergidas com água destilada serviram como controle dos experimentos. A concentração do inóculo de *X. gardneri* foi ajustada em espectrofotômetro (U-1800 spectrophotometer) para 0,6 valores de densidade ótica (D.O.) a 600 nm. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida durante 48 h, a fim de favorecer o estabelecimento do patógeno sobre as plantas. Foram realizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um vaso contendo duas plantas. A avaliação da severidade da doença realizada 20 dias após a inoculação das plantas utilizando escala diagramática da mancha bacteriana desenvolvida por Mello et al. (1997). Foram avaliadas duas folhas de cada planta (terceira e quarta folha definitiva), totalizando quatro folhas por vaso (repetição).

4.3.8 Proteção e resistência genética de tomateiros contra a mancha bacteriana

Primeiramente foram realizados ensaios para seleção das cultivares com diferentes níveis de resistência para posterior ensaio de proteção. Nestes, as sementes de tomate das cultivares Santa Cruz Kada, Carolina, Santa Clara, Coração de Boi e Laura foram adquiridas em estabelecimentos agropecuários de Florianópolis. As demais cultivares foram disponibilizadas por fornecedores conforme descrito na Tabela 2.1. Aos 15 dias após a sementeira, as mudas de tomateiros foram transplantadas para vasos de 2 L contendo terra preta. Quando as plantas apresentavam 5 folhas definitivas, foram inoculadas com a bactéria *X. gardneri* (0,6 unidades de absorbância a 600 nm) e permaneceram em câmara úmida por 48 h. Vinte dias após a inoculação foi realizada avaliação da severidade, conforme escala diagramática desenvolvida por Mello e colaboradores (1997). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições e cada repetição constituída de duas plantas por vaso.

Tabela 2.1 Lista de cultivares de tomateiro utilizadas nos ensaios de resistência genética.

Cultivares	Distribuidor	Hábito	Tipo
Santa Cruz Kada	ISLA	Indeterminado	Salada
Carolina	ISLA	Indeterminado	Cereja
SANTY	SAKATA	Indeterminado	Salada
Natália	SAKATA	Indeterminado	Salada
Valerin	SAKATA	Indeterminado	Salada
GOLD	Agrocinco Seeds of Value	Determinado	Salada
BRS Nagai	Agrocinco Seeds of Value	Indeterminado	Saladete
BRS Montese	Agrocinco Seeds of Value	Indeterminado	Saladete
BRS Sena	Eagle Flores Frutas & Hortaliças	Determinado	Saladete
Santa Clara 5800	FELTRIN	Indeterminado	Salada
Coração de Boi	FELTRIN	Indeterminado	Salada
Laura	FELTRIN	Determinado	Saladete
Forty	SYNGENTA	Indeterminado	Salada

Posteriormente, nos ensaios de proteção, foram selecionadas e utilizadas as sementes das cultivares Natália, BRS Sena e Forty. As plantas foram cultivadas conforme as condições anteriormente descritas no experimento com a cultivar Santa Cruz Kada e comparadas a esta cultivar (padrão de suscetibilidade). Os polissacarídeos PRC e PSHII, na concentração 1,5 mg/mL, foram aplicados quatro dias antes da

inoculação sobre as cultivares Santa Cruz Kada (k), Forty (f), Natália (n) e BRS Sena (s). Água destilada e ASM (Acibenzolar-S-metil) a 50 mg/L serviram como controle negativo e positivo, respectivamente. O ASM foi utilizado como produto comercial Bion®, fornecido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., São Paulo, SP. A inoculação foi conduzida de maneira semelhante ao experimento de proteção com a cultivar Santa Cruz Kada. Os dados de severidade foram coletados de acordo com os valores da escala diagramática desenvolvida por Mello et al. (1997). As avaliações foram realizadas aos 20 e 30 dias após a inoculação (Figura 2.2).

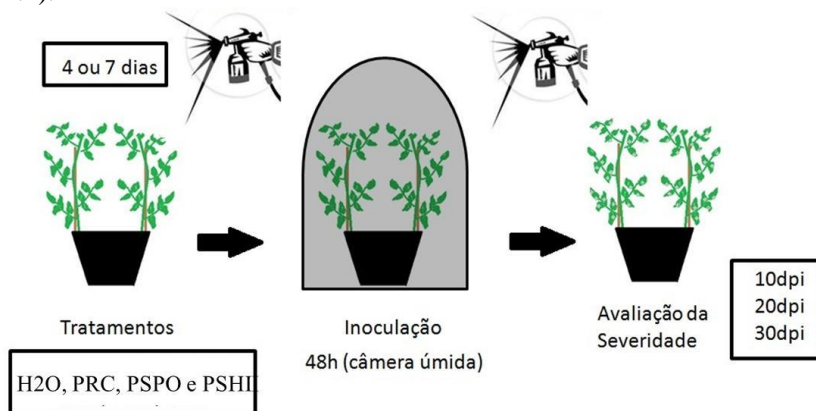


Figura 2.2 Esquema das condições nos ensaios de proteção de plantas de tomate em casa de vegetação (dpi: dias após inoculação).

4.3.9 Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa

Plantas de tomateiro das cultivares Santa Cruz Kada (Isla Sementes Ltda) e Natália (Sakata Seed Sudamerica Ltda), com a presença de cinco folhas definitivas, foram utilizadas. As plantas foram pulverizadas com água ou PSHI (1.5 mg/mL), e coletadas a terceira e quarta folha (da base para o ápice) nos tempos 0, 4, e 7 dias após os tratamentos, sendo que após a coleta do dia 4, as plantas foram inoculadas com *X. gardneri* na concentração 0,6 unidades de absorbância (D.O.; 600 nm). Foram analisadas 4 repetições por tratamento e cada repetição foi constituída por um vaso contendo duas

plantas. De cada planta foram coletadas duas folhas, totalizando 4 folhas amostradas por repetição (vaso). Nas coletas, os folíolos foram dispostos em envelopes de papel-alumínio e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer – 80 °C, até serem processadas para as diferentes análises bioquímicas.

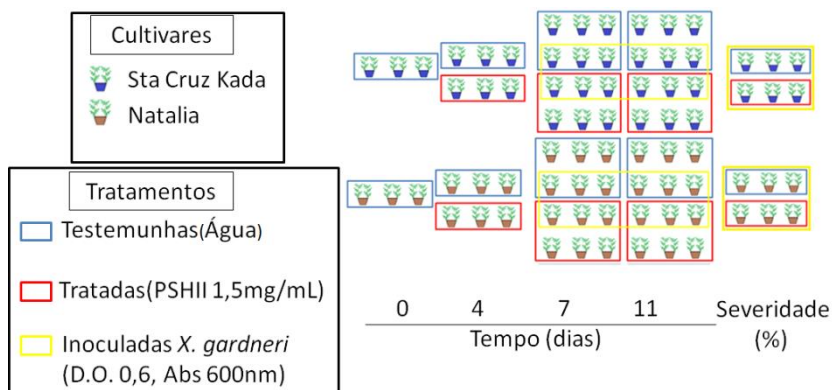


Figura 2.3 Esquema ilustrativo das coletas de amostras vegetais no decorrer dos experimentos.

a) Determinação da atividade de POD e FAL em tomateiros

Para a determinação da atividade de peroxidases (POD) e fenilalanina amônia-liases (FAL), o tampão de extração foi fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,5), contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, polivinilpirrolidona 1% (PVP). As amostras de folíolos de tomateiro (100 mg de peso fresco) foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionadas de 1mL de tampão de extração, e submetidos à centrifugação refrigerada a 4 °C, 20.000 g, durante 30 minutos. O sobrenadante foi separado e considerado como extrato proteico para análise enzimática.

A atividade de peroxidases foi determinada utilizando como substrato o guaiacol (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A reação ocorreu em microplaca, onde foram utilizados 290 µl de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM, adicionados a 10 µL do extrato proteico da amostra. As microplacas foram alocadas em leitor de microplaca (Spectramax®) previamente ajustado para as condições da reação (leitura da

absorbância a 470 nm, durante 4 minutos a 30 °C, e valores de densidade óptica retirados a cada 30 segundos). Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470 nm por mg de proteína por minuto ($DO_{470\text{ nm}}\text{mg proteína}^{-1}\text{ min}^{-1}$).

A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada segundo Falcón et al. (2008) com algumas modificações. Como substrato foi utilizado fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). Foram utilizados 450 μL do substrato, acrescentado de 50 μL do extrato proteico e a mistura incubada a 40 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de HCl 5 N e banho de gelo por 5 min. Por fim, 300 μL de água foram adicionados e a absorbância da solução final mensurada a 290 nm em leitor de microplaca (Spectramax®). Os resultados foram expressos como nmol de ácido *trans*-cinâmico formado por mg proteína⁻¹min⁻¹ (nmol ácido *trans*-cinâmico mg proteína⁻¹ min⁻¹) (Coqueiro, 2010).

As atividades de enzimas peroxidases e fenilalanina amônia-liases foram expressas em relação ao conteúdo de proteínas totais das amostras, o qual foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para tal, foram adicionados 60 μL de reagente concentrado de Bradford a 240 μL do extrato proteico. Após 10 min foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm em leitor de microplaca (Spectramax®). A concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em μg de albumina de soro bovino (BSA), utilizando-se de curva padrão de concentrações de BSA variando de 0 a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

b) Determinação do teor de compostos fenólicos e flavonóides.

As quantificações dos compostos fenólicos totais e flavonóides foram feitas de acordo com Coqueiro (2010). Cada amostra, representada por 100 mg de tecido foliar fresco, foi homogeneizada com 3 mL de metanol 80 % acidificado (metanol:HCl = 80:1, V/V). O extrato passou por incubação no escuro durante 1h em temperatura ambiente, seguindo de centrifugação a 3.500 rpm por 5 minutos.

Para análise dos compostos fenólicos, uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi misturada com 0,5 mL de metanol 95% (v/v) e agitados em vórtex. Junto à mistura foram acrescentados 1 mL de etanol 95%, 1 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau. Após 5 minutos adicionou-se 1 mL de Na_2CO_3 5% (m/v) e posterior incubação

da amostra no escuro por 1 h. A absorvância da solução final foi medida a 725 nm e a quantificação de fenólicos baseada em uma curva padrão (0,5-100 μg) de ácido gálico. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca (μg EAG g^{-1} MF).

A determinação de flavonóides totais aconteceu através do método espectrofotométrico, misturando-se 0,5 mL da amostra, 2,5 mL de etanol 99% e 0,5 mL de cloreto de alumínio a 2% (em metanol). Após uma hora de repouso no escuro, foram conduzidas medições de absorvância a 420 nm e o teor de flavonóides expresso em μg de equivalentes de quercetina por g de massa fresca (μg EQ/gMF).

4.3.10 Análises estatísticas

Os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados através do teste t de Student, ao nível de 5% de probabilidade, quando a comparação se restringiu a apenas dois tratamentos (amostras independentes). A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene. Quando comparados mais de dois tratamentos, foi utilizada análise de variância (ANOVA simples ou fatorial) com a separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (GÓMEZ & GÓMEZ, 1984). As análises estatísticas foram realizadas através do software Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Caracterização dos polissacarídeos

Em relação ao teor de proteínas totais, as frações polissacarídicas diferiram significativamente entre si. PRC apresentou maior quantidade de proteínas, seguidos por PSHII e PSPO respectivamente. O teor de carboidratos totais também foi maior em PRC em relação às demais frações, no entanto entre PSHII e PSPO não foram encontradas diferenças. As suspensões PSHII, PRC e PSPO não diferiram em relação à intensidade de dispersão e valores de pH. Quanto ao potencial zeta (mV), PSHII apresentou os menores valores em relação às frações PRC e PSPO. No parâmetro condutividade, os três polissacarídeos em teste diferiram significativamente entre si. Os maiores valores de condutividade foram detectados para PSPO enquanto PRC apresentou

os menores valores. Os conteúdos de fenólicos totais foram igualmente distintos entre os polissacarídeos, com destaque para PSHII que apresentou maior teor destes compostos. Na porcentagem de captura do radical livre DPPH, houve ênfase na taxa de redução média com o uso de PSHII comparado a PRC e PSPO que apresentaram valores médios semelhantes (Tabela 2.2).

Os espectros dos polissacarídeos (PRC, PSPO e PSHII) analisados sob espectroscopia de infravermelho tipo IV estão representados na Figura 2.4 e os principais grupos funcionais associados aos picos demonstrados na Tabela 2.3. Os espectros de infravermelho de PSHII e PSPO apresentaram picos coincidentes intensos amplamente estirados em 3416 cm^{-1} característica de grupos hidroxila e bandas fracas C-H a 2926 cm^{-1} . Em PRC foi observado um pico intenso amplamente estirado em 3422 cm^{-1} (ligação O-H existente no hidrogênio do polímero) e uma banda a 2930 cm^{-1} designada para a vibração de estiramento C-H. Os picos de absorção relativamente fortes a 1654 cm^{-1} , 1631 cm^{-1} e 1623 cm^{-1} verificados respectivamente para PRC, PSHII e PSPO, indicaram a existência de ligações C=O. Em PRC o sinal a 1537 cm^{-1} foi atribuído à vibração de C-O. Os picos de absorção a 1452 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} e 1405 cm^{-1} (respectivamente para PRC, PSPO e PSHII) foram atribuídos à vibração do C-H. A caracterização por IR (infravermelho) de PSHII mostrou possível absorção típica de anel de piranose a 1150 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} e para PRC a 1134 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} . Além disso, os picos a 577 cm^{-1} em PSHII e PRC evidenciaram a presença de $-\text{CH}_2$. Em PRC foi observado uma forte absorção característica a 811 cm^{-1} correspondente à existência de manose com configuração α -anomérica (CHEN et al., 2011; WANG et al., 2015).

Tabela 2.2 Caracterização de polissacarídeos extraídos de resíduo cervejeiro (PRC), substrato de cultivo de *P. ostreatus* (PSPO) e basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII) quanto ao teor de proteínas, carboidratos totais, intensidade de dispersão (Kcps), pH, potencial Zeta (mV), condutividade (mS/cm), fenólicos totais (μg EAG) e captura de DPPH livre (%).

Característica	Polissacarídeo (1.5 mg/mL)		
	PRC	PSPO	PSHII
Proteínas totais (mg/mL)	0,023 \pm 0,001 A	0,011 \pm 0,0005 C	0,019 \pm 0,001 B
Carboidratos totais (mg/mL)	1,109 \pm 0,109 A	0,563 \pm 0,016 B	0,462 \pm 0,110 B
Intensidade de dispersão(Kcps)	125,3 \pm 19,9 A	180,5 \pm 51,3 A	175,3 \pm 15,5 A
pH	5,5 \pm 0,20 A	5,7 \pm 0,15 A	5,4 \pm 0,04 A
Potencial Zeta (mV)	-10,9 \pm 0,7 A	-9,7 \pm 0,4 A	-22,9 \pm 0,5 B
Condutividade (mS/cm)	0,066 \pm 0,001 C	0,467 \pm 0,007 A	0,212 \pm 0,001 B
Fenólicos totais (μg EAG)	24,9 \pm 0,4 B	23,0 \pm 0,1 C	89,8 \pm 3,7 A
Captura de DPPH (%)	45,2 \pm 3,7 B	45,8 \pm 2,3 B	89,5 \pm 0,2 A

Médias (média de três determinações (triplicatas) por análise, \pm DP: desvio padrão) seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

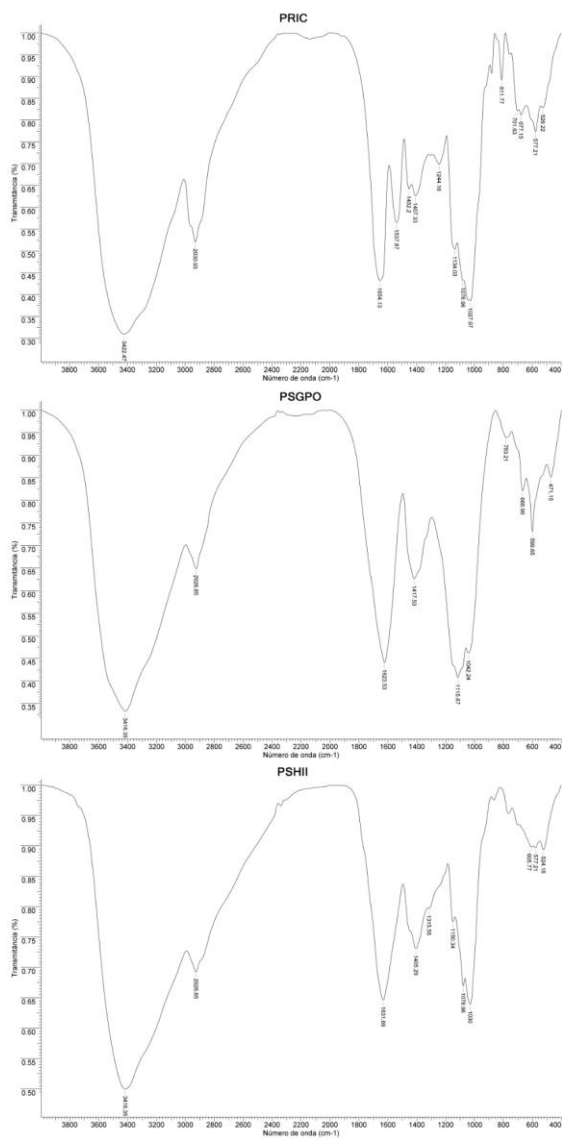


Figura 2.4 Espectros FTIR de polissacarídeos extraídos de resíduo cervejeiro (PRC), substrato de cultivo de *P. ostreatus* (PSPO) e basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII) em pastilhas de KBr.

Tabela 2.3 Principais vibrações características dos grupos funcionais associados na superfície dos polissacarídeos PRC, PSPO e PSHII nos espectros FTIR.

Grupos funcionais associados	Polissacarídeos (Posição das bandas/cm ⁻¹)		
	PRC	PSPO	PSHII
O-H	3422	3416	3416
C-H	2930	2926	2926
C=O	1654	1623	1631
C-O	1537	-	-
C-H	1452	1417	1405
Anel de piranose	1134/1078/1027	-	1150/1078/1030
-CH₂	577	-	577
Manose α-anomérica	811	-	-

4.4.2 Efeito inibitório dos polissacarídeos sobre o patógeno

Não foi observado qualquer efeito inibidor significativo dos polissacarídeos PRC e PSPO ao patógeno *X. gardneri* (dados não mostrados). Experimentos realizados com PSHII (polissacarídeos de corpos de frutificação *L. edodes*) revelaram efeito antimicrobiano. A análise estatística detectou diferenças significativas no fator concentração e a interação entre os fatores tempo e concentração. O menor número de unidades formadoras de colônias foi encontrado na concentração mais elevada de PSHII (2,25 mg/mL) após 6 horas de contato com a suspensão bacteriana (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 Número de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFCs/mL) de *X. gardneri* após diferentes tempos de contato (0, 2, 4, e 6h) com polissacarídeos extraídos de basidiocarpos residuais da produção de *L. edodes* (PSHII a 0; 0,25; 0,75 e 2,25 mg/mL).

Tempo de contato	PSHII (mg/mL)			
	0	0,25	0,75	2,25
0h	5.550 Aa	6.740 Aa	8.180 Aa	9.200 Aa
2h	8.460 Aa	6.140 Aa	5.970 Aa	4.600 BCa
4h	8.980 Aa	6.270 Aa	4.600 Ab	7.100 ABa
6h	8.740 Aa	9.860 Aa	6.390 Aa	2.600 Cb

Médias seguidas de mesma letra (Maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados transformados em $\log(x)$ para obter a homogeneidade das variâncias (teste de Levene).

4.4.3 Bioensaios em casa de vegetação e sala de crescimento

As aplicações de polissacarídeos PRC, PSPO e PSHII (1.5 mg/mL) em plantas de tomateiro reduziram significativamente a severidade (%) da mancha bacteriana em cotilédones quando comparadas à testemunha dos bioensaios realizados em sala de incubação. Os polissacarídeos reduziram em média 44.8% a severidade (%) em comparação com a testemunha. Nos bioensaios realizados em casa de vegetação, com a utilização dos polissacarídeos extraídos a partir de basidiocarpos residuais do cultivo de Shiitake (PSHII) houve maior redução (49,0%) na severidade da mancha bacteriana em relação à testemunha. PRC e PSPO também reduziram a severidade (%) nas plantas jovens (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em cotilédones e plantas de tomateiro (cv. Santa Cruz Kada) tratadas com os polissacarídeos de resíduo cervejeiro (PRC), de substrato após cultivo de *P. ostreatus* (PSPO) e de basidiocarpos residuais do cultivo de shiitake (PSHII) em relação ao controle (não tratado). Florianópolis, 2015.

Tratamento (1,5 mg/mL)	Severidade±DP (%)	
	Cotilédones	Plantas Jovens
H ₂ O	3,3±0,7 a	24,8±2,1 a
PRC	1,7±0,3 b	17,3±2,4 b
PSPO	1,7±0,2 b	16,5±2,2 b
PSHII	1,6±0,3 b	12,6±2,3 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). DP: desvio padrão da média.

4.4.4 Proteção de plantas de tomate da cv. Santa Cruz Kada em casa de vegetação

Plantas de tomateiro da cv. Santa Cruz Kada pulverizadas com os polissacarídeos PSPO e PSHII na concentração 0,5 mg/mL 4 dias antes da inoculação com *X. gardneri* apresentaram reduções nos valores de severidade em relação ao controle. Quando as plantas foram tratadas 7 dias antes da inoculação, os tratamentos PRC (0,5 mg/mL) e PSHII (0,5 e 1,5 mg/mL) reduziram a severidade da mancha bacteriana significativamente em relação à testemunha (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 Severidade da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada tratadas com polissacarídeos de resíduo cervejeiro (PRC), do substrato de *P. ostreatus* (PSPO) e de basidiocarpos residuais de *L. edodes* (PSHII), nas concentrações 0,5 e 1,5 mg/mL, com os intervalos entre tratamento e inoculação de 4 e 7 dias. Florianópolis, 2014.

Tratamento	Severidade±DP (%)	
	Intervalo entre tratamento e inoculação	
	4dias	7dias
ÁGUA	14,3±4,8 a	17,3±5,0 a
PRC (0,5 mg/mL)	9,7±2,3 ab	6,9±2,4 b
PRC (1,5 mg/mL)	8,0±2,7 ab	9,0±4,2 ab
PSPO (0,5 mg/mL)	5,8±3,2 b	9,3±3,8ab
PSPO (1,5 mg/mL)	9,9±4,5 ab	9,8±8,5 ab
PSHII (0,5 mg/mL)	7,2±3,2 b	8,2±1,6 b
PSHII (1,5 mg/mL)	8,4±3,7 ab	7,6±3,9 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Avaliação realizada 20 dias após a inoculação. DP: desvio padrão da média.

Houve efeito de concentração de PSHII sobre a severidade da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em plantas de tomateiro (com a presença de 5 folhas definitivas). Na avaliação realizada 20 dias após a inoculação, reduções na severidade da doença foram apontadas em relação à testemunha independente da concentração (0,5; 1,5 ou 4,5) de polissacarídeos utilizada (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 Efeito de polissacarídeos extraídos a partir de basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII) nas concentrações 0; 0,5; 1,5 e 4,5 mg/mL sobre a severidade da mancha bacteriana do tomateiro (cv. Santa Cruz Kada). Florianópolis, 2014.

Tratamento	Severidade±DP (%)	
	Intervalo entre o tratamento e inoculação	
	4dias	7dias
ÁGUA	9,8±2,7 a	7,1±2,5 a
PSHII (0,5 mg/mL)	4,3±2,1 b	3,0±2,2 b
PSHII (1,5 mg/mL)	3,5±1,9 b	1,8±0,9 b
PSHII (4,5 mg/mL)	1,9±1,3 b	1,1±0,5 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Avaliação realizada 20 dias após a inoculação. DP: desvio padrão da média.

4.4.5 Proteção de cultivares de tomate com diferentes níveis de resistência à mancha bacteriana

Nos ensaios de seleção, os resultados demonstraram que as cultivares Santa Cruz Kada e Valerin apresentaram maior suscetibilidade à bacteriose; as cultivares BRS Sena e Laura exibiram maior resistência, enquanto os demais genótipos avaliados foram considerados moderadamente resistentes (Figura 2.5).

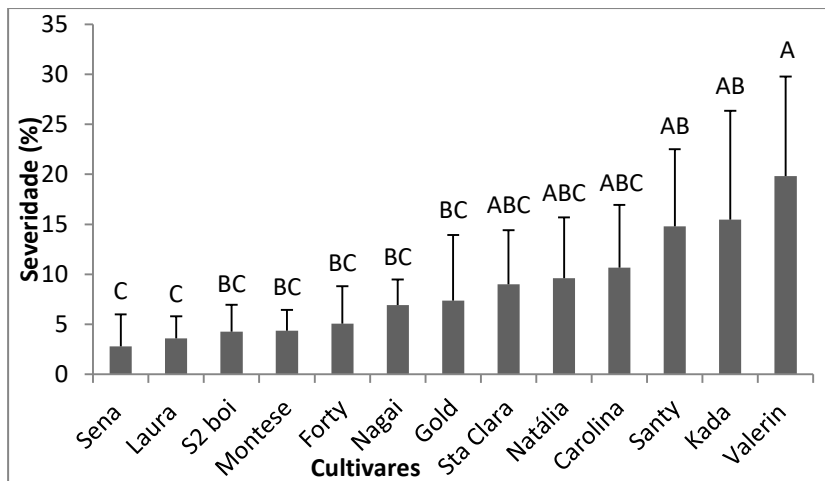


Figura 2.5 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* nas cultivares de tomate BRS Sena, BRS Montese, BRS Nagai, Forfy, Gold, Laura, Coração de boi, Sta. Clara 5800, Sta. Cruz Kada, Carolina, Santy, Natália e Valerin. Os dados foram transformados para raiz quadrada (\sqrt{x}) e letras semelhantes não demonstram diferenças significativas entre as cultivares (ANOVA *one way*). Avaliação da severidade realizada 20 dias após inoculação. Florianópolis, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média.

Nos ensaios de proteção, os dados relacionados com a severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em diferentes cultivares de tomateiro indicaram diferenças significativas para os tratamentos e cultivares, mas não houve interação entre esses dois fatores. Os polissacarídeos PSHII e PRC (1,5 mg/mL) reduziram significativamente a severidade (%) em comparação com plantas das diferentes cultivares pulverizadas com água.

Os menores níveis de doença foram observados em plantas tratadas com o indutor comercial ASM. Independentemente do tratamento aplicado, a cv. BRS Sena apresentou os menores valores em porcentagem de severidade. As cultivares Forty e Natália foram consideradas moderadamente resistentes, enquanto a cv. Santa Cruz Kada apresentou a maior susceptibilidade à mancha bacteriana (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* nas cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Forty, Natália e BRS Sena; após a pulverização de água destilada (H₂O), ASM (50 mg/L), polissacarídeos (1,5 mg/mL) extraídos a partir de levedura residual cervejeira *S. cerevisiae* (PRC) e basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII). Florianópolis, 2015.

Cultivar/ Tratamento	Severidade (%)				Média ± DP*
	20 dias após inoculação				
	H ₂ O	PRC	PSHII	ASM	
BRS Sena	3,1±2,9	3,5±1,9	2,0±0,8	1,1±0,4	2,4±1,6b
Natália	6,0±3,0	5,0±2,4	2,0±1,1	1,1±0,6	3,5±2,0ab
Forty	8,7±3,3	3,1±1,8	4,2±3,9	1,8±1,5	4,5±2,2ab
Kada	9,7±6,4	5,1±4,0	6,6±3,1	1,0±0,3	5,6±2,5a
Média ± DP*	6,9±2,8 A	4,1±2,1 AB	3,7±2,0 BC	1,2±1,2 C	

Cultivar/ Tratamento	Severidade (%)				Média ± DP*
	30 dias após inoculação				
	H ₂ O	PRC	PSHII	ASM	
BRS Sena	7,6±3,8	4,6±1,7	2,5±1,7	1,5±0,5	4,0±2,1b
Natália	13,2±7,0	8,1±3,1	4,6±2,1	2,3±1,7	7,0±2,8b
Forty	14,1±4,4	6,0±2,7	5,5±4,2	2,3±1,4	7,0±2,8b
Kada	23,1±8,9	10,7±4,9	12,5±3,5	4,2±1,8	12,6±3,8a
Média ± DP*	14,5±4,0 A	7,3±2,9 B	6,2±2,6 B	2,6±1,7 C	

*Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos e minúsculas entre cultivares indicam diferenças pelo teste de Tukey a 5% de significância (ANOVA *one way*). Os dados foram transformados raiz quadrada para obter homogeneidade das variâncias (Teste de Levene). DP: desvio padrão da média.

4.4.6 Avaliação dos mecanismos bioquímicos de defesa

Em relação à atividade cinética de peroxidases, a análise fatorial indicou interação entre os fatores estudados (tratamento e cultivar) quatro dias após o tratamento (4 dat). Os maiores valores médios na

atividade de POD foram observadas na cv. Santa Cruz Kada (suscetível), significativamente maior que o observado na cv. Natália (moderadamente resistente). As plantas mais suscetíveis (Santa Cruz Kada) tratadas com PSHII apresentaram maior atividade da enzima em comparação com plantas não tratadas. Após 7 dias de aplicação dos tratamentos (três dias após a inoculação) não houve interação entre os fatores analisados. No entanto, a reação enzimática na cv. Santa Cruz Kada foi maior que a observada na cv. Natália. A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) também foi maior na cv. Santa Cruz Kada quando comparada a cv. Natália quatro dias após o tratamento (4 dat). A influência do tratamento PSHII sobre a atividade FAL não foi observada. No sétimo dia, a atividade da FAL foi significativamente reduzida na cv. Natália após a inoculação do patógeno (Figura 2.6).

Os fenóis totais (FENOL) mostraram uma tendência oposta; cv. Natália teve o maior teor de compostos fenólicos totais. Por outro lado, os fenólicos totais foram reduzidos na cv. Natália 7 dat resultante da inoculação. Além disso, PSHII aumentou as quantidades de compostos fenólicos totais na cv. Santa Cruz Kada 7 dat em comparação com as plantas controle, independente de serem inoculadas com *X. gardneri* ou não. Quanto ao conteúdo de flavonóides (FLAVO), os maiores valores médios foram encontrados na cv. Santa Cruz Kada aos 4 dat comparado a cv. Natalia. No tempo 7 dat, os teores de flavonóides não apresentaram diferenças significativas entre as cultivares e tratamentos (Figura 2.7).

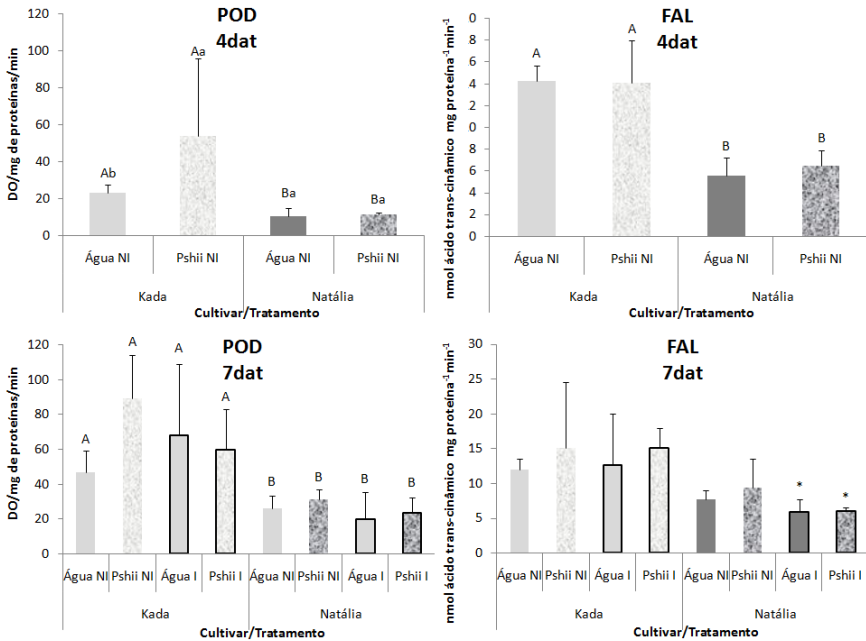


Figura 2.6 Atividade de peroxidases (POD) e fenilalanina amônia-liases (FAL) em folhas de diferentes cultivares de tomateiro (Santa Cruz Kada e Natália) tratadas com água ou polissacarídeos extraídos do cogumelo *L. edodes* (PSHII 1,5 mg/mL) e inoculadas (I) ou não (NI) com *X. gardneri* (D.O. 0,6; 600nm). Valores médios das coletas realizadas aos 4 dias após o tratamento (4 dat) e aos 7 dat (3 dias após a inoculação). Os dados foram transformados em raiz quadrada para obter homogeneidade das variâncias (Teste de Levene). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula entre cultivares; minúscula entre tratamentos, dentro da cultivar) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). * Efeito da inoculação em relação aos respectivos controles não inoculados. Florianópolis, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média.

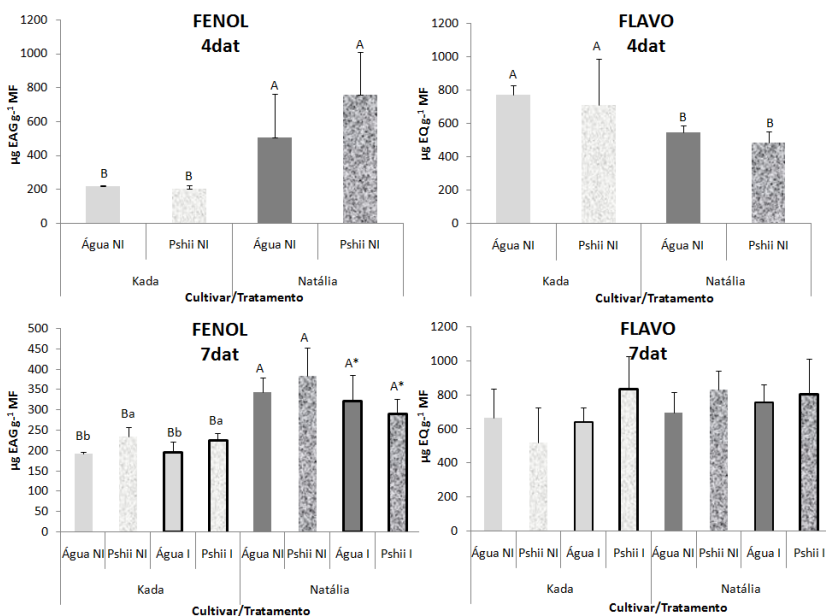


Figura 2.7 Compostos fenólicos totais (FENOL) e conteúdo de flavonóides (FLAVO) em folhas de diferentes cultivares de tomateiro (Santa Cruz Kada e Natália) tratadas com água ou polissacarídeos extraídos do cogumelo *L. edodes* (PSHII 1,5 mg/mL) e inoculadas (I) ou não (NI) com *X. gardneri* (D.O. 0,6; 600 nm). Valores médios das coletas realizadas aos 4 dias após o tratamento (4 dat) e aos 7 dat (3 dias após a inoculação). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula entre cultivares; minúscula entre tratamentos, dentro da cultivar) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). *Efeito da inoculação em relação aos respectivos controles não inoculados. Florianópolis, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média.

4.5 DISCUSSÃO

Polissacarídeos extraídos de biomassa fúngica de *L. edodes* (PSHII), *S. cerevisiae* (PRC) e *P. ostreatus* (PSPO) apresentaram potencial para o controle dos sintomas foliares da mancha bacteriana no

tomateiro, com destaque para PSHII, que reduziu consistentemente a severidade da doença nos diferentes estágios fenológicos do tomateiro.

Os fungos são organismos frequentemente cultivados pelo homem com a finalidade de obtenção de recursos. A levedura *S. cerevisiae* é utilizada para fabricar pães, vinhos, cerveja, etanol e serve como modelo em muitos estudos biológicos (SHERMAN, 2002). Os cogumelos ligninolíticos *L. edodes* (shiitake) e *P. ostreatus* (ostra) apresentam propriedades medicinais interessantes (COHEN, PERSKY e HADAR, 2002; HEARST et al., 2009) e maiores facilidades de cultivo (PICCININ, 2000). As atividades humanas e de outros sistemas vivos envolvem a produção de resíduos, que representam materiais excedentes não efetivamente utilizados. Muitos destes resíduos (sólidos ou líquidos) têm altos valores de demanda biológica por oxigênio e podem causar problemas que incluem os custos do recolhimento, tratamento, eliminação e a perda de matéria-prima valiosa. Por outro lado, os resíduos podem ser utilizados como incremento na alimentação animal e fertilizantes para culturas agrícolas (ISRILIDES e PHILIPPOUSSIS, 2003). Adicionalmente, biomassas residuais podem ser utilizadas para extração de subprodutos, caso dos polissacarídeos utilizados nesta pesquisa.

As preparações de subprodutos a partir de resíduos contendo biomassa fúngica são muito diversas e com resultados contraditórios. Aqui, optou-se por trabalhar com polissacarídeos como forma de padronização dos produtos utilizados. Sabe-se que os polissacarídeos de Ascomicetos e Basidiomicetos possuem conhecidas propriedades antioxidantes, estimulantes do sistema imunológico, antitumorais e antimicrobianas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015). Além disso, existe um interesse crescente dedicado aos carboidratos e seus papéis na imunidade da planta. Alguns deles são elicitores de defesa em plantas enquanto outros agem como moléculas sinalizadoras de um modo semelhante aos hormônios vegetais (TROUVELOT et al., 2014).

No presente estudo, os polissacarídeos PRC, PSPO e PSHII foram caracterizados, revelando que o processo de obtenção foi bem sucedido. As características dos componentes químicos presentes nas frações extraídas (PRC, PSPO e PSHII), associadas aos estiramentos observados nas três amostras via espectroscopia de infravermelho, refletem picos e padrões semelhantes aos encontrados em polissacarídeos purificados descritos na literatura (CHEN et al., 2011; WANG et al., 2015). A análise sobre espectroscopia de infravermelho é adotada em virtude de ser uma técnica utilizada por alguns grupos de

pesquisa para analisar a presença de glucanos lineares (THANARDKIT et al., 2002).

Uma especialidade visualizada durante a caracterização dos polissacarídeos foi a presença de um maior conteúdo de carboidratos totais observados para PRC em relação PSPO e PSHII, que pode estar relacionado à grande quantidade de açúcar presente no malte utilizado no processo cervejeiro. Outro fator analisado refere-se à estabilidade das suspensões polissacarídicas avaliadas em função dos valores do potencial zeta e de pH. Dentre os polissacarídeos avaliados, PSHII apresentou maior tendência à estabilidade em relação à PRC e PSPO (Zeta-Meter, Inc, 2005).

Entre os três polissacarídeos estudados, PSHII foi o único a exibir algum efeito *in vitro* sobre *X. gardneri*. O efeito antimicrobiano do PSHII contra *X. gardneri* pode estar relacionado ao seu elevado teor de compostos fenólicos e a alta atividade antioxidante. Este resultado está em comum acordo com os encontrados por Wang et al. (2015), que também relataram sobre a potencial atividade antioxidante, ao caracterizar frações de polissacarídeos extraídos do micélio de *L. edodes*. A correlação entre o aumento na atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos foi também detectada nos extratos dos cogumelos *L. edodes* e *Volvariella volvacea* (CHEUNG et al., 2003). Além disso, alguns compostos fenólicos têm atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos bacterianos (VATTEM e SHETTY, 2003). A atividade antimicrobiana de extratos de *L. edodes* foi também demonstrada contra a fitobactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (TONUCCI-ZANARDO et al., 2015) e contra bactérias patogênicas humanas *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus* (HIRASAWA et al., 1999; KITZBERGER et al., 2007).

A atividade antimicrobiana de PSHII só foi atingida numa dose considerada alta para um bioensaio *in vitro*. Dessa forma, acredita-se que a proteção conferida pelo polissacarídeo nas plantas de tomate esteja associada à indução de resistência. Esta também foi a hipótese levantada por outros pesquisadores para explicar o efeito da aplicação de extratos aquosos de *L. edodes* sobre plantas de tomate e reduções dos sintomas de doenças bacterianas causadas por *Ralstonia solanacearum* (Silva et al., 2007), *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* (SILVA et al. 2013) e *Xanthomonas vesicatoria* (DI PIERO e

PASCHOLATI 2004). Além da proteção contra bactérias, o extrato de *L. edodes* também protegeu plantas de maracujá contra *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, reduzindo a incidência da doença em 60% (DI PIERO et al. 2010).

Nas plantas de tomate do presente estudo, a ativação de repostas de defesa foi visualizada através de aumentos na atividade de peroxidases e acúmulo de compostos fenólicos totais em folhas de tomateiros suscetíveis tratados com PSHII. De acordo com Soyly et al. (2003), durante as interações incompatíveis entre planta-micróbio ou tratamentos com elicitores, aumentos na atividade POD são frequentemente associados com a incorporação progressiva de compostos fenólicos da parede celular. O reforço da parede celular vegetal aumenta a resistência das plantas à enzimas/toxinas degradadoras produzidas pelos patógenos e atua como barreira física, reduzindo a severidade dos sintomas.

A atividade de peroxidases em plantas de tomate também foi aumentada após o tratamento com extratos de *L. edodes* contra *R. solanacearum* (SILVA et al., 2007). Além disso, Di Piero et al. (2006) constataram que indutores de corpos de frutificação de *L. edodes* parcialmente purificados tiveram efeito protetor sobre plantas de pepino contra *C. lagenarium*. Os autores observaram um aumento sistêmico na atividade enzimática em folhas de pepino, considerando a atividade de POD como um marcador bioquímico de resistência na interação entre as plantas de pepino e *C. lagenarium*. No presente estudo, considera-se que os valores observados para POD em folhas tratadas contribuiu para a redução dos sintomas da doença bacteriana.

Adicionalmente, o teor de compostos fenólicos totais aumentou após o tratamento com PSHII (1,5 mg/mL) e inoculação com *X. gardneri*. Resultados semelhantes foram encontrados por Coqueiro et al. (2011), indicando que a capacidade do polissacarídeo quitosana (3 mg/mL) em reduzir a severidade da mancha bacteriana pode estar associada com sua ação sobre o metabolismo fenilpropanóide de tomateiros, promovendo a síntese de compostos fenólicos, envolvidos em mecanismos bioquímicos e estruturais de defesa da planta, em resposta contra a infecção por *X. gardneri*. O rápido acúmulo, oxidação e polimerização de compostos fenólicos no local da infecção pode limitar o desenvolvimento do patógeno.

Quando considerado o intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação (4 ou 7 dias), não foi observada diferença entre os períodos testados. Isto indica provavelmente que os polissacarídeos estão agindo ao longo de um período de tempo mais prolongado. Coqueiro e Di Piero

(2011), estudando o mesmo patossistema (tomateiro – *X. gardneri*) observaram que o polissacarídeo quitosana (3 mg/mL) não foi eficiente para controlar os sintomas da doença com um intervalo de 6 dias entre o tratamento e a inoculação. Os autores relatam que, quando utilizado em intervalos curtos (24, 48 e 72 h) antes da inoculação, a quitosana conferiu proteção de tomateiros (70%) contra a mancha bacteriana. Neste sentido, a resposta de defesa de uma planta aos elicitores depende do agente patogênico, concentração do eliciador utilizado e também do intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência.

Quanto aos genótipos do tomateiro, a cultivar Santa Cruz Kada apresentou os maiores níveis de severidade e foi considerada a mais suscetível à *X. gardneri* que as outras cultivares analisadas (Forty, Natália e BRS Sena). Embora a cv. Santa Cruz Kada tenha sido a mais suscetível, observou-se uma maior atividade de enzimas de defesa nesta cultivar que a detectada em plantas de tomate com menor susceptibilidade (Natália). Provavelmente, as plantas mais resistentes possuem mecanismos de defesa não específicos como teores mais elevados de compostos fenólicos que são compostos de ação reconhecida contra patógenos. Resultados semelhantes foram mostrados por Mandal et al. (2011), onde o conteúdo de fenólicos totais e deposição de lignina foram significativamente maiores em plantas de tomate resistentes inoculadas com *Ralstonia solanacearum* em comparação com plantas de tomate suscetíveis inoculadas. Assim, barreiras estruturais e bioquímicas são formadas nos sítios de infecção como ligninas e fitoalexinas em algumas espécies (FALCON et al., 2008). Outra hipótese está relacionada com os aspectos morfológicos das diferentes cultivares de tomateiro e a relação da anatomia foliar com a incidência e severidade de doenças. O estudo dos estômatos e epidermes foliares de espécies do gênero *Lycopersicon* revelou uma relação entre frequência de estômatos, tamanho dos estômatos e algumas características morfológicas foliares com a resistência à mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (RAMOS et al., 1992). Assim, estudos acerca das características histoquímicas de cultivares se mostram necessários para maiores esclarecimentos durante a interação planta, elicitador e patógeno.

Na cultivar moderadamente resistente (Natália), a atividade de peroxidases foi significativamente inferior em comparação a maior

atividade detectada em plantas suscetíveis da cv. Santa Cruz Kada. No conteúdo de fenólicos os maiores valores foram encontrados na cultivar Natália e diferenças significativas em relação à cv. Santa Cruz Kada. De acordo com Kuhn e Pascholati (2010) a redução dos compostos fenólicos pode ter ocorrido principalmente à medida que as células foram se tornando lignificadas, uma vez que compostos fenólicos são substrato para a síntese de lignina pela ação de peroxidases. Tomados juntos, a menor atividade de peroxidases e consequente maior teor de fenólicos na cultivar moderadamente resistente ajudariam a explicar, ao menos em parte, o menor nível de doença nesse material.

Em relação à proteção de cultivares, as aplicações de PRC e PSHII (1,5 mg/mL) protegeram as cultivares Santa Cruz Kada, Forty, Natália e BRS Sena, reduzindo significativamente a severidade da mancha-bacteriana em comparação com as plantas controle. Este efeito demonstra ampla gama de ação destes polissacarídeos, pois o controle da doença foi observado em materiais com diferentes níveis de resistência. Os menores valores em porcentagem de severidade foram observados na cv. BRS Sena, independentemente do tratamento, relacionados com o processo de seleção conduzido na Embrapa Hortaliças, DF. Esta cultivar é considerado o primeiro híbrido de tomate industrial do Brasil com certa tolerância à mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas* spp. (QUEZADO-DUVAL et al., 2014).

Mesmo que o indutor de resistência comercial (ASM) tenha resultado na maior proteção contra *X. gardneri* detectada em todas as cultivares analisadas, métodos adicionais para o controle de doenças de plantas que possam ser utilizados para a produção orgânica enfatizam a importância da utilização de polissacarídeos. ASM é um indutor químico de resistência que pode resultar em custo fisiológico e reduzir parâmetros relacionados à produtividade, como altura de plantas ou peso fresco e seco da parte aérea (BARBOSA et al., 2008). Louws et al. (2001) sugerem que as plantas de tomateiro exibem um custo fisiológico relacionado com a resistência adquirida na ausência da pressão dos agentes patogênicos e que a concentração de ASM e o número de aplicações necessitam ser otimizadas para limitar quedas no rendimento. Neste sentido, são necessários estudos sobre o efeito dos polissacarídeos nas plantas relacionados às possíveis alterações no rendimento da produção de frutos e investigações a cerca de aspectos fisiológicos (medição de clorofila, fluorescência da clorofila, taxa fotossintética, taxa transpiratória e condutância estomática) durante a interação eliciador-planta-patógeno.

Assim, as aplicações de polissacarídeos extraídos a partir da biomassa fúngica residual promoveram maior resistência de plantas de tomate à infecção da mancha bacteriana. Os polissacarídeos foram eficazes como controle alternativo na proteção de culturas, provavelmente por indução de resistência. Diferentes estágios de desenvolvimento e genótipos do hospedeiro foram capazes de responder a presença de moléculas de polissacarídeos derivados dos resíduos de origem fúngica e reduzir os sintomas causados por *X. gardneri*. Testes em maior escala serão necessários para avaliar a relação custo-eficácia da extração dos polissacarídeos e a aplicação sobre culturas comerciais em condições de campo.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA H.O., BARBOSA M.O., MARQUES A.E., PEREIRA T.H.A., JÚNIOR M.J.M., TESSAROLLO N.G., GAMES P.D., DE BARROS E.G., STOLF-MOREIRA R., MARCELINO-GUIMARÃES F.C., ABDELNOOR R.V., PEREIRA P.R.G., BARACAT-PEREIRA M.C. Differentially regulated induced resistance marker enzymes in soybean genotypes resistant and susceptible to Asian soybean rust. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v.47, p.163–172, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200003>

BARBOSA, M.A.G, LARANJEIRA D., COELHO R.S.B. Physiological cost of induced resistance in cotton plants at different nitrogen levels. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.4, p.338-342, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052008000400007>

BEATTIE, G., LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, v.89, n.5, p.353–359, 1999. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.5.353>

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* v.72, p.248-254, 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

CARDOSO, M.L.; CONRAD, R.W.; LUZ, M.L.G.S.; LUZ, C.A.S.; GADOTTI, G.I.; GOMES, M.C. Análise econômica dos processos de produção para ampliação de uma microcervejaria em Canela-RS. *Revista Técnico-Científica do CREA-PR*, v.1, p.1-14, 2015.

CARRER FILHO R., ROMEIRO R.S., GARCIA F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus*. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, n.6, p.457-460, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000600010>

CHEN Y., MAO W., TAO H., ZHU W., QI X., CHEN Y., LI H., ZHAO C., YANGA Y., HOUA Y., WANGA C., LI N. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresource Technology*, v.102, n.17, p.8179–8184, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.048>

CHEUNG L.M., CHEUNG P.C.K., OOI V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, v. 81, n.2, p.249–255, 2003. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00419-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00419-3)

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.58, n.5, p.582-594, 2002. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0930-y>

COQUEIRO D.S.O. Atividade de quitosanas e da fração polissacarídica de babosa para o controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e pinta preta (*Alternaria solani*) em plantas de tomate. 2010. 118f. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. 2010.

COQUEIRO D.S., DI PIERO R.M. Antibiotic activity against *Xanthomonas gardneri* and protection of tomato plants by chitosan. *Journal of Plant Pathology* v.93, p.337-344, 2011. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v93i2.1188>

COQUEIRO D.S., MARASCHIN M., DI PIERO R.M. Chitosan Reduces Bacterial Spot Severity and Acts in Phenylpropanoid Metabolism in Tomato Plants. *Journal of Phytopathology*, v.159, p.488-494, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01791.x>

COSTA J.R., ARAÚJO E.R., BECKER W.F., FERREIRA M.A.S.V., QUEZADO-DUVAL A.M. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. *Tropical Plant Pathology*, v.37, p.149-154, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762012000200009>

DEEKSHA J., HOODA K.S., BHATT J.C., MINA B.L., GUPTA H.S. Suppressive effects of composts on soil-borne and foliar diseases of French bean in the field in the western Indian Himalayas. *Crop Protection*, v.28, n.7, p.608-615, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2009.03.009>

DI PIERO R.M. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. 2003. 157f. Tese. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil. 2003.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeitos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. *Summa Phytopathologica* v.30, p.57-62, 2004.

DI PIERO R.M., WULFF N.A., PASCHOLATI S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. *Brazilian Journal of Microbiology* v.37, p.169-174, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000200015>

DI PIERO R.M., DE NOVAES Q.S., PASCHOLATI, S.F. Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Lentinula edodes* mushrooms on the infection of passionflower with *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.53, n.2, p.269-278, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000200004>

FALCÓN A., CABRERA J.C., COSTALES D., RAMÍREZ M.A., CABRERA R., TOLEDO V., MARTÍNEZ-TÉLLEZ M.A. The effect of

size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24, 103-112, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9445-0>

FAOSTAT, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. Production, Crops, Tomatoes, Brazil. 2013. Disponível em:
 <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>> Acesso em: 02 out. 2014.

GÓMEZ, K.A., GÓMEZ, A. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. Singapore; John Wiley & Sons, 1984. 660 p.

GOROVITS R., AKAD F., BEERY H., VIDAUSKY F., MAHADAV A., CZOSNEK H. Expression of stress-response proteins upon whitefly-mediated inoculation of *Tomato yellow leaf curl virus* in susceptible and resistant tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* v.20, n.11, p.1376-1383, 2007. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1376>

HAHN M.G., ALBERSHEIM P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiology*, v.62, n.1, p.107-111, 1978.

HAHN M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, n.3, p.387-412, 1996.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.387>

HAMASAKI T., KITAGAWA T., YASUHARA T. Efficacy of Yeast Cell Wall Extract, a Byproduct of Beer Brewing, in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Culture. *2nd International Conference on Environment, Energy and Biotechnology* v.76, n.5, p.21-25, 2014.
<http://dx.doi.org/10.7763/IPCBE.2014.V76.5>

HAMMERSHMIDT R., NUCKLES E.M., KUC J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, v.20, p.73-82, 1982. [http://dx.doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90025-X](http://dx.doi.org/10.1016/0048-4059(82)90025-X)

HEARST, R.; NELSON, D.; MCCOLLUM, G.; MILLAR, B.C.; MAEDA, Y.; GOLDSMITH, C.E.; ROONEY, P.J.; LOUGHREY, A.;

RAO, J.R.; MOORE, J.E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, v. 15, n. 1, p. 5–7, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2008.10.002>

INCORPORATION, Zeta-Meter. Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes. *Zeta-Meter, Inc*, v. 765, 2005.

ISRILIDES, C.; PHILIPPOUSSIS, A. Bio-technologies of recycling agroindustrial wastes for the production of commercially important polysaccharides and mushrooms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 20, p. 247–259, 2003.

JETIYANON K., PLIANBANGCHANG P. Lipopolysaccharide of *Enterobacter asburiae* strain RS83: A bacterial determinant for induction of early defensive enzymes in *Lactuca sativa* against soft rot disease. *Biological Control* v.67, n.3, p.301-307, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.014>

KRCMAR, P.; NOVOTNY, C.; MARAIS, M.F.; JOSELEAU, J.P. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 24, n.1, p.61-64, 1999.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00072-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00072-5)

KLARZYNSKI, O., PLESSE, B., JOUBERT, J. M., YVIN, J. C., KOPP, M., KLOAREG, B., FRITIG, B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, v.124, n.3, p.1027–1038, 2000. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.124.3.1027>

KITZBERGER, C.S.G., SMANIA JUNIOR A., PEDROSA R.C., FERREIRA S.R.S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, v.80, n.2, p.631-638, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.013>

LOUWS F.J., WILSON M., CAMPBELL H.L., CUPPELS D.A., JONES J.B., SHOEMACKER P.B., SAHIN F., MILLER S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, v.85, p.481-488, 2001.

LUIZ C., ROCHA NETO A.C., DI PIERO R.M. Induced resistance in tomato leaves against *Xanthomonas gardneri* by polysaccharides from plant or microbial origin. *Journal of Plant Pathology*, v.97, p.119-127, 2015. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I1.029>

MANSFIELD J., GENIN S., MAGORI S., CITOVSKY V., SRIARIYANUM M., RONALD P., DOW M.A.X., VERDIER V., BEER S.V., MACHADO M.A., TOTH I.A.N, SALMOND G., FOSTER G. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v.13, p.614-629, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>

MARIAN M., OGAWA K., YOSHIKAWA Y., TAKASAKI S., USAMI A., SHIMIZU M., MIYAZAWA M., HYAKUMACHI M. Agroecosystem Development of Industrial Fermentation Waste - Suppressive Effects of Beer Yeast Cell Wall Extract on Plant Diseases. *Current Environmental Engineering*, v.1, p.207-211, 2014.

MANDAL S., DAS R.K., MISHRA S. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.49, p.117-123, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.10.006>

MASUKO, T., MINAMI, A., IWASAKI, N., MAJIMA, T., NISHIMURA, S.I., LEE, Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, v.339, n.1, p.69-72, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>

MELLO S.C., TAKATSU A., LOPES C.A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.447-448, 1997.

MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., HE, S.Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of*

Phytopathology, n.46, p.101–122, 2008.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>

MINAMI T., YANAKA T., TAKASAKI S., KAWAMURA K., HIRATSUKA K. In vivo bioluminescence monitoring of defense gene expression in response to treatment with yeast cell wall extract. *Plant Biotechnology*, v.28, p.481–484, 2011.

<http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.11.1020a>

NARS, A., LAFITTE, C., CHABAUD, M., DROUILLARD, S., MELIDA, H., DANOUN, S., LE COSTAOUÉ T., REY T., BENEDETTI J., BULONE V., BARKER D.G., BONO J.J., DUMAS B., JACQUET C., HEUX L., FLIEGMANN J., BOTTIN, A. *Aphanomyces euteiches* Cell Wall Fractions Containing Novel Glucan-Chitosaccharides Induce Defense Genes and Nuclear Calcium Oscillations in the Plant Host *Medicago truncatula*. *PLoS ONE*, v.8, n.9, p.1–13, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075039>

NARUSAKA M., MINAMI T., IWABUCHI C., HAMASAKI T., TAKASAKI S., KAWAMURA K., NARUSAKA Y. Yeast cell wall extract induces disease resistance against bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* crop. *PLoS ONE*, v.10, n.1, p.1–14, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115864>

NEWMAN M.A., ROEPENACK-LAHAYE E.V., PARR A., DANIELS M.J., DOW J.M. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant Journal*, v.29, n.4, p.487–495, 2002. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.00233.x>

ORS M., SIAH A., RANDOUX B., SELIM S., COULEAUD G., MAUMENE C., SAHMERS K, REIGNAULT PH., HALAMA P., 2014. Protection efficacy and modes of action of two resistance inducers on wheat against *Septoria tritici* blotch. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* (may):1–8., 2014.

OSIŃSKA-JAROSZUK M., JAROSZ-WILKOŁAZKA A., JAROSZUK-ŚCISEŁ J., SZAŁAPATA K., NOWAK A., JASZEK M.,

OZIMEK E., MAJEWSKA M. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.12, p.1823-1844, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-015-1937-8>

PARADA R.Y., MURAKAMI S., SHIMOMURA N., EGUSA M., OTANI H. Autoclaved spent substrate of hatakeshimeji mushroom (*Lyophyllum decastes* Sing.) and its water extract protect cucumber from anthracnose. *Crop Protection*, v.30, n.4, p.443-450, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.11.021>

PARADA R.Y., MURAKAMI S., SHIMOMURA N., EGUSA M., OTANI H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. *Journal of Phytopathology*, v.160, p.390-396, 2012. <http://doi.org/10.1111/J.1439-0434.2012.01916.X>

PACUMBABA R.P., BEYL C.A., PACUMBABA JR. R.O. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. *Plant Disease*, v.83, n.1, p.20-23, 1999. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.1.20>

PAULERT R., TALAMINI V., CASSOLATO J.E.F., DUARTE M.E.R., NOSEDA M.D., SMANIA JUNIOR A., STADNIK M.J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata*, on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection*, v.116, n.6, p.263-270, 2009.

PICCININ, E. 2000. Cultivo do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) em toras de eucalipto: teoria e prática. Série Produtor Rural. São Paulo, 48 p.

POPOVA, M.P., BANKOVA V.S., BOGDANOV, S., TSVETKOVAC, I., NAYDENSKIC, C., MARCAZZAND, G.L., SABATINI, A.G. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, v.38, p.306-311, 2007. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2007013>

PUNJA Z.K., UTKHEDE R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, v.21, p.400-407, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00193-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00193-8)

QUEZADO-DUVAL A.M., LEITE R.P., TRUFFI D., CAMARGO L.E.A. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central west Brazil. *Plant Disease*, v.88, p.157-161, 2004. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.157>

QUEZADO-DUVAL, A.M., NASCIMENTO A.R.P., MOITA N.C., ASSUNÇÃO A.W., GOLYNSKI A., INOUE-NAGATA A., OLIVEIRA A.K., CASTRO R.T., MELO Y.O., JUNQUEIRA B. Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. *Horticultura Brasileira*, v.32, p.446-452, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620140000400012>

RAMOS L.J., NARAYANAN K.R., MCMILLAN R.T. Association of stomatal frequency and morphology in *Lycopersicon* species with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Pathology*, v.41, p.157-164, 1992. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02334.x>

REFAIE, F., ESMAT, A. Characterization of polysaccharopeptides from *Pleurotus ostreatus* mycelium: assessment of toxicity and immunomodulation *in vivo*. *Micologia Aplicada Internacional*, v.21, n.2, p.67-65, 2009.

SHERMAN, F. Getting Started with Yeast • Contents. *Methods in Enzymology*, v. 350, p. 3-41, 2002.

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*. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, n.3, p.189-196, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000300002>

SILVA R.F., PASCHOLATI S.F., BEDENDO I.P. Induced resistance in tomato plants to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by *Lentinula edodes* and *Agaricus subrufescens* (syn. *Agaricus brasiliensis*). *Journal of Plant Pathology*, v.95, p.285-297, 2013.

SOYLU S., BAYSAL Ö., SOYLU E.M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-*S*-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science*, v.165, p.1069-1075, 2003.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00302-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00302-9)

STATSOFT. Electronic Statistics Textbook. Tulsa. Disponível em:
<<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>>

THANARDKIT P., KHUNRAE P., SUPHANTHARIKA M., VERDUYN C. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n.6, p.527-539, 2002.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1016322227535>

TONUCCI, N.M. Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (Shiitake) sobre *Colletrotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* PV. *Passiflorae* e *Tobacco mosaic virus* (TMV). Piracicaba, 2004. 87 p. Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004.

TROUVELOT, S.; HÉLOIR, M.C.; POINSSOT, B.; GAUTHIER, A.; PARIS, F.; GUILLIER, C.; COMBIER, M.; TRDÁ, L.; DAIRE, X.; ADRIAN, M. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*, v.5, (novembro), n.592, p.1-14, 2014.
<http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00592>

VALE F.X.R., FERNANDES FILHO E.I., LIBERATO J.R. QUANT: A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, 105, 2003.

VATTEM D. A., SHETTY K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinula edodes* using a solid-state system. *Process*

Biochemistry, v.39, n.3, p.367-379, 2003.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00089-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00089-X)

WANG J., WANG H.Y., XIA X.M., LI P.P., WANG K.Y. Inhibitory effect of sulfated lentinan and lentinan against tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco seedlings. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.61, p.264-269, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.005>

WANG L., WANG C., GAO X., XU N., LIN L., ZHAO H., JIA S., JIA L. Purification, characterization and anti-aging capacity of mycelia zinc polysaccharide by *Lentinus edodes* SD-08. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.15, n.111, p.1-11, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0630-7>

WILLIAMS, B.C.; MCMULLAN, J.T.; MCCAHEY, S. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Bioresource Technology*, v.79, p.227-230, 2001.

WOISKY R.G., SALATINO A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, v.37, p.99-105, 1998.

<http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

YOHALEM D.S., NORDHEIM E.V., ANDREWS J.H. The effect of water extracts of spent mushroom compost on apple scab in the field. *Phytopathology*, v.86, p.914-922, 1996.

YOSHIOKA, Y., TABETA, R., SAITO, H., UEHARA, N., FUKUOKA, F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (FR.) QUÉLL.: Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research*, v.140, n.1, p.93-100, 1985. [http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)85052-7](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(85)85052-7)

ZANARDO N.M.T., PASCHOLATI S.F., FIALHO M.B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, p.1499-1503, 2009.

5 CAPÍTULO 3 - ASPECTOS FISIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DA RESISTÊNCIA INDUZIDA POR POLISSACARÍDEOS EM GENÓTIPOS DE TOMATEIRO COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA

5.1 RESUMO

Polissacarídeos extraídos de biomassa descartada da produção do cogumelo *L. edodes* foram estudados quando ao potencial uso para o controle da mancha bacteriana no tomateiro. A fração polissacarídica total foi recolhida após precipitação etanólica (80%; 1:1) de extrato autoclavado de basidiocarpos residuais do cultivo de *Lentinula edodes* (PSHII). Três cultivares de tomateiro (Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena) com a presença de cinco folhas definitivas foram pulverizadas com suspensão polissacarídica (1,5 mg/mL) ou água destilada, aplicados quatro dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*. Nos tempos 0 (plantas não tratadas), 4, 7 e 10 dias da aplicação dos tratamentos foram analisados parâmetros fotossintéticos (taxa fotossintética, taxa transpiratória e condutância estomática) e aspectos histopatológicos (polissacarídeos ácidos e neutros, compostos fenólicos, densidade estomática, espessura do mesófilo e de células paliçádicas). A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 7 e 14 dias após a inoculação. Plantas tratadas com PSHII apresentaram menor condutância estomática e taxa de transpiração foliar em relação à testemunha, momentos antes da inoculação. Comparando-se cultivares com diferentes níveis de resistência à bacteriose, os menores valores na taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração observados na cultivar Santa Cruz Kada podem estar relacionados à maior suscetibilidade deste material e possa auxiliar na explicação em termos de uma maior resistência genética visualizada nos genótipos Natália e BRS Sena. Adicionalmente as estas constatações e referente aos aspectos anatômicos, a cv. BRS Sena (mais resistente) apresentou os maiores valores de densidade estomática, espessura do mesófilo e do parênquima paliçádico em relação à cv. Santa Cruz Kada. Nos aspectos histopatológicos da interação *X. gardneri* x BRS Sena, foram observadas proliferação celular próxima ao possível sítio de infecção e deposição de compostos fenólicos nas células do interior do mesófilo, enquanto que nas cvs. Santa Cruz Kada e Natália a deposição destes compostos fenólicos foi observada de maneira mais frequente nas células próximas à epiderme. O estudo traz informações sobre o controle

alternativo da mancha bacteriana em diferentes genótipos de tomateiro e elucidada alguns dos mecanismos naturalmente apresentados pelas plantas para resistir à bacteriose.

Palavras-chave: *Lentinula edodes*; Polissacarídeos; Resistência; Tomateiro; *Xanthomonas gardneri*.

5.2 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicon* L.) é um dos frutos mais produzidos e consumidos no mundo. Entretanto, no cultivo do tomateiro são frequentes os ataques de agentes patogênicos que prejudicam os rendimentos da produção. Para se protegerem, as plantas evoluíram estratégias de defesa para contra-atacar os invasores potenciais (PIETERSE, et al., 2005). Na resposta imune da planta, existe a indicação de que as redes de sinalização envolvidas no desenvolvimento e na defesa estejam interligadas (PIETERSE et al., 2009). Deste modo, as plantas possuem barreiras físicas e químicas pré-formadas e, são capazes de desenvolver mecanismos de proteção induzidos em resposta ao ataque de patógenos (TANG et al., 1999).

No caso específico de tomateiros, uma maior resistência contra patógenos pode ser relacionada às alterações bioquímicas visualizadas através de acúmulos de compostos autofluorescentes, deposição de calose e lignina (TANG et al., 1999). Genótipos dentro de uma mesma espécie apresentam características anatômicas particulares (presença de tricomas, compactação de células, entre outras) que auxiliam na resistência aos microrganismos (SILVA et al., 2005). Neste sentido, os estudos sobre mecanismos pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzíveis) são inestimáveis, em função do entendimento da natureza dos mecanismos de defesa vegetal relacionados na interação planta patógeno. No entanto, o grau de envolvimento dos fatores estruturais e bioquímicos pré e pós-formados nas respostas de resistência, pode variar em função da idade da planta, órgão/tecido afetados, estado nutricional, condições ambientais e nas diferentes interações hospedeiro-patógeno (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

Entre as principais doenças que acometem a cultura do tomateiro está a mancha bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas*. Bactérias que podem limitar a produção de tomates no mundo em virtude de redução na produtividade, através da destruição da parte aérea e redução da área fotossintética. No Brasil, os sintomas desta doença são relacionados às espécies *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*, frequentemente encontradas em plantios destinados ao consumo *in natura* e industrial de tomates. A doença é considerada de difícil controle, principalmente porque a dispersão bacteriana pode ocorrer via sementes, a eficiência do controle químico é baixa e faltam cultivares com resistência (QUEZADO-DUVAL et al., 2004; ARAÚJO et al., 2012). Nas medidas de controle pode-se considerar a aplicação de substâncias bactericidas à base de cobre. No entanto, a seleção e persistência de isolados resistentes a vários desses produtos químicos têm sido relacionadas com a baixa eficiência de controle da doença observada. Portanto, são necessárias abordagens alternativas ou complementares para o manejo da mancha bacteriana (QUEZADO-DUVAL et al., 2003; MOSS et al., 2007; ARAÚJO et al., 2012; ABBASI et al., 2015).

Dentre as alternativas sustentáveis para o manejo da doença são incluídas práticas orgânicas, manejo integrado, controle biológico, uso de híbridos resistentes e indução de resistência (BURKETOVA et al., 2015). Em plantas, a resistência induzida ocorre através da aplicação de uma variedade de agentes indutores que podem ser de origem biótica e/ou abiótica. Dependendo das vias de sinalização ativadas, podem ocorrer respostas de proteção locais ou sistêmicas. Geralmente, as induções tendem a ser de largo espectro, de longa duração (raramente completas) e reduzem os sintomas de doenças entre 20 e 85% (WALTERS et al., 2013). No entanto, as respostas quanto à capacidade de indução de resistência entre genótipos podem variar significativamente (SHARMA, BUTZ e FINCKH, 2010; ORS et al., 2014).

As plantas percebem os agentes elicitores (padrões moleculares associados a patógenos ou micróbios, PAMPs ou MAMPs) através de receptores transmembrana de reconhecimento de padrões (PRRs) (Jones e Dangl 2006). Após a detecção da presença dos elicitores pela planta, são desencadeadas cascatas de sinalização e respostas múltiplas de defesa. Dentre as respostas de defesa da planta estão a sinalização de estresse, biossíntese de hormônios de defesa, produção de espécies reativas de oxigênio, acúmulo de fitoalexinas, fechamento estomático, ativação de genes de defesa, fortalecimento da parede celular e morte

celular por reação de hipersensibilidade. No entanto, os patógenos empregam efetores para suprimir a ativação de respostas de defesa da planta para promover a patogênese (MENG e ZHANG, 2013). No gênero *Xanthomonas*, efetores do tipo III são reconhecidos por suprimir a resposta de defesa basal da planta chamada PTI (PAMP-*triggered immunity*) provocada pela resposta imune relacionada à PAMPs (WHITE et al., 2009).

Moléculas elicitoras podem pertencer a várias classes bioquímicas incluindo carboidratos, (glico) lipídios e (glico) peptídeos. Entretanto, avanços recentes na percepção das plantas e eventos de defesa induzida tem chamado atenção para o uso de carboidratos do tipo “PAMPs, MAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados a danos)” (TROUVELOT et al., 2014). Na literatura são encontrados diversos relatos de sacarídeos (mono, oligo e poli) com características elicitoras e capacidade de proteção contra fitopatógenos que podem ser extraídos de crustáceos (COQUEIRO, MARASCHIN e PIERO, 2011; FELIPINI e DI PIERO, 2013), plantas (LUIZ et al., 2012, 2015, 2016), algas (DELGADO, FREITAS e STADNIK, 2013), cogumelos (DI PIERO, WULFF e PASCHOLATI, 2006; WANG et al., 2013) e culturas microbianas (HAHN e ALBERSHEIM, 1978; NEWMAN et al., 2002; JETIYANON e PLIANBANGCHANG, 2013). No entanto, são poucos os trabalhos que utilizaram resíduos para a extração de polissacarídeos e abordaram características histofisiológicas da interação entre elicitor, planta e patógeno.

A fotossíntese é um processo fisiológico afetado por patógenos foliares e a medição deste parâmetro fornece informações sobre os mecanismos envolvidos durante a interação planta-patógeno. Patógenos causadores de manchas foliares no tomateiro podem reduzir a área fotossinteticamente ativa e comprometer a produtividade da planta (REIS e BOITEUX 2006). Neste mesmo sentido, a técnica de avaliação da fluorescência da clorofila é empregada para monitorar a atividade fotoquímica da fotossíntese, ou ainda outras técnicas com auxílio de imagens podem ser utilizadas para detectar alterações em folhas infectadas (SILVEIRA et al., 2015). Estudos citológicos descrevem a possibilidade de serem visualizadas as consequências após o estímulo à elicitação e durante o subsequente processo de infecção do patógeno na planta. As associações ocorrem em função da localização espaço-temporal das respostas de defesa envolvidas na resistência induzida que

podem demonstrar restrição no crescimento e desenvolvimento do patógeno, ou barreiras químicas estruturais e biológicas elaboradas nos tecidos vegetais nas áreas de penetração de agentes patogênicos. Demonstrando indícios que eliciadores biológicos e/ou químicos podem desempenhar papel-chave no controle de doenças em plantas (BENHAMOU e NICOLE, 1999).

Outro fator considerado está na necessidade por novos produtos fitossanitários e as restrições de recursos que levam a indústria a buscar novos usos para os resíduos (LIN et al., 2013). Extraídas a partir de levedura residual de cervejaria, β -glucanas e manoproteínas induziram a expressão de genes de defesa em *Arabidopsis thaliana*, ativando precocemente as vias de sinalização do jasmonato/etileno e posteriormente a via do ácido salicílico (NARUSAKA et al., 2015). Esse trabalho procurou demonstrar o potencial de obter elicitores de defesa vegetal a partir de um material biológico que teria um destino indeterminado.

Na literatura, trabalhos com o cogumelo comestível *Lentinula edodes* (Berk.) descrevem a possibilidade de controle de fitopatógenos (PACUMBABA, BEYL e PACUMBABA Jr., 1999; DI PIERO, 2003; TONUCCI, 2004; SILVA et al., 2007; TOFFANO, 2010). Neste contexto, a presente pesquisa apresenta viabilidade por envolver o uso de basidiocarpos desconsiderados para comercialização e a aplicabilidade dos mesmos para extração de polissacarídeos com a finalidade de utilizá-los no controle de doenças em plantas.

A produção de cogumelos Shiitake é considerada uma atividade rentável. O valor do quilograma recebido pelo produtor pode variar entre R\$30,00 e R\$50,00. A venda do produto *in natura* é realizada em bandejas e uma parte da produção considerada fora do padrão pode ser desidratada e comercializada (BETT, 2016). Além disso, basidiocarpos descartados da produção de *Shiitake* têm sido utilizados como fonte de proteínas, aminoácidos e vitaminas do complexo B em suplementos para a alimentação animal (PICCININ, 2000). Entretanto, os rendimentos na produção de Shiitake são influenciados pelo tipo de inóculo (linhagem), o tipo de madeira e o tamanho das partículas do meio (DONOGHUE e DENISON, 1996). Outras alterações na produtividade são relacionadas às variações climáticas. Uma produção de melhor qualidade é obtida nos períodos frios. Em épocas quentes, a produção pode cair cerca de 20% em função das temperaturas elevadas e ataque de pragas (BETT, 2016). Desta forma, a disponibilidade de basidiocarpos residuais de *L. edodes* pode ser variável, no entanto a aplicabilidade deste resíduo na área agrícola apresenta potencial considerável.

Dessa maneira, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da fração polissacarídica obtida a partir de extrato de sólido residual à base de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) no controle da mancha bacteriana do tomateiro. Entre os assuntos abordados nesta pesquisa estão a descrição da proteção das plantas, análises de possíveis alterações histofisiológicas decorrentes da resistência induzida por polissacarídeos (PSHII) em três genótipos de tomateiro e esclarecimentos sobre os mecanismos que as plantas de tomate naturalmente exibem para resistir a *X. gardneri*.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Preparo do extrato e obtenção dos polissacarídeos

Os basidiocarpos residuais da produção de *Lentinula edodes* (cogumelo Shiitake), fornecidos pelo Dr. Márcio José Rossi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Santa Catarina, Brasil), foram cortados e usados nas proporções (1:3; m/v). Pesou-se a quantidade de 500 g e foi adicionado 1,5 L de água destilada (basidiocarpo/água). O conteúdo passou por autoclavagem de 30 minutos a 121 °C e, após resfriar, foi filtrado em dupla camada de gaze esterilizada, obtendo-se o extrato aquoso bruto dos corpos de frutificação de Shiitake ESHII (PARADA et al., 2012).

O extrato aquoso (ESHII) foi submetido à precipitação com etanol (80%) na proporção etanol-extrato de 1:1 (v/v) (HAHN e ALBERSHEIM, 1978) e a suspensão mantida a -20 °C durante 24 horas (DELGADO et al., 2013). Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado considerado a fração de polissacarídeos total do extrato (PSHII). A fração foi seca em estufa a 45 °C até o peso constante, triturada em moinho analítico e armazenada a -20 °C. A fração de polissacarídeos foi solubilizada em água destilada sob agitação constante em homogeneizador Ultra Turrax durante 3 minutos a 13.500 rpm antes da pulverização sobre as plantas.

5.3.2 Efeito de PSHII na interação tomateiro e *X. gardneri*.

a) Resistência de cultivares a mancha-bacteriana

A fração de polissacarídeos considerada efetiva na redução dos sintomas da doença PSHII foi avaliada sobre plantas com diferentes níveis de resistência à *Xanthomonas gardneri*. As sementes das cultivares Natália e BRS Sena foram gentilmente cedidas por Sakata Seed Sudamerica e Eagle Flores Frutas & Hortaliças, respectivamente. Sementes de tomate da variedade Santa Cruz Kada (Paulista) foram adquiridas de fornecedores da empresa ISLA sementes. As sementes das cultivares Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena foram semeadas em bandejas de isopor contendo o substrato Tropstrato HT Hortaliças® e mantidas em casa de vegetação com uma temperatura média de $25,3 \pm 3,7$ °C. Quinze dias após a semeadura, duas plântulas foram transplantadas para vasos de 2 L, contendo solo e substrato Tropstrato HT (4:1, v/v).

Plantas com a presença de cinco folhas definitivas foram pulverizadas com (15 mL por planta) a fração polissacarídica PSHII (1,5 mg/mL) ou água destilada, aplicados quatro dias antes da inoculação com auxílio de pistola acoplada a compressor de ar.

Quatro dias após os tratamentos, as plantas foram inoculadas com uma suspensão do isolado de *Xanthomonas gardneri* (Xan 166 - identificado por BOX-PCR junto a Embrapa Hortaliças, Brasília-DF). O isolado foi preservado em tampão fosfato (8.6 mM K_2MPO_4 ; 7.4 mM KH_2PO_4) e a repicagem realizada em meio nutriente ágar (NA, 28 g/L, HIMEDIA®). A suspensão bacteriana foi obtida por adição de água destilada ao meio de crescimento de colônias (com 48 h de cultivo a 25 °C), com auxílio da alça de Drigalsky e a concentração ajustada em espectrofotômetro (D.O. 0,6; 600 nm). As plantas inoculadas ou não com suspensão de *X. gardneri* foram mantidas em câmara úmida por 48 h (LUIZ et al., 2012).

A severidade da doença foi avaliada utilizando uma escala diagramática (MELLO et al., 1997) constituída por cinco níveis percentuais de área foliar infectada (1%, 5%, 15%, 25% e 50%). A terceira e quarta folhas verdadeiras localizadas da base para o ápice das plantas foram analisadas, em um total de quatro folhas por unidade experimental e cinco repetições por tratamento. Os valores de severidade foram registrados 7 e 14 dias após a inoculação.

b) Parâmetros relacionados à fotossíntese

O efeito de PSHII sobre as cultivares Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena foi avaliado em função de possíveis alterações em parâmetros relacionados à fotossíntese (taxa transpiratória $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, condutância estomática e taxa fotossintética). Em diferentes momentos dos experimentos foram realizadas medições com auxílio de medidor de clorofila portátil SPAD-502 (Minolta, EUA), fluorímetro portátil de luz modulada MINI-PAM (Walz, Alemanha) e sistema portátil de medições da fotossíntese por meio de um analisador de trocas gasosas por infravermelho, IRGA (LI-6400 XT, LI-COR).

b.1) Índice SPAD e Fluorescência da clorofila

As determinações relacionadas ao índice de clorofila (unidades SPAD) e fluorescência da clorofila (fluorescência inicial - F0, fluorescência máxima - Fm, rendimento quântico do Fotossistema II - Fv/Fm) foram realizadas aos 2, 4, 6 e 10 dias após a aplicação de PSHII.

O medidor de clorofila portátil SPAD-502 foi utilizado para monitorar o índice do teor de clorofila em unidades SPAD (Soil Plant Analyzer Develop). O SPAD-502 tem uma área de medição de $0,06 \text{ cm}^2$ e calcula o índice em unidades SPAD " com base na absorvância a 650 e 940 nm. As leituras foram obtidas na terceira e quarta folhas verdadeiras localizadas da base para o ápice das plantas. As medições foram realizadas aos 2 e 4 dias posteriores ao tratamento e aos 2 e 6 dias após a inoculação (6 e 10 dias após a aplicação de PSHII). Três medições separadas foram realizadas nos folíolos distais da inserção das folhas ao ramo. A média aritmética de doze leituras por vaso contendo duas plantas foi utilizada para as análises de cada tratamento composto por 5 repetições.

As variáveis de fluorescência da clorofila foram determinadas com o fluorímetro portátil de luz modulada MINI-PAM. Os dados obtidos foram fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm) e rendimento quântico do Fotossistema II (Fv/Fm). As medições foram efetuadas com o auxílio de pinça de metal (DLC-8) acoplado ao sensor de MINI-PAM colocado na região mediana dos folíolos, na porção adaxial do limbo foliar, evitando-se a nervura central. Antes das

determinações individuais, as plantas foram mantidas no escuro durante 30 minutos, para adquirir a condição de "aberta" e estimar a extinção fotoquímica da fluorescência. Um pulso de 0,3 s de saturação de luz foi utilizado para promover o fechamento dos centros de reação e avaliar a eficiência de excitação do Fotossistema II. De maneira similar à coleta de dados para os valores de índice SPAD, as leituras para a obtenção das variáveis de F0, Fm e Fv/Fm foram realizadas aos 2, 4, 6 e 10 dias após aplicação de PSHII (2 e 4 dias após o tratamento e 2 e 6 dias após a inoculação). Os dados de fluorescência obtidos foram armazenados automaticamente no MINI-PAM e, em seguida, transferidos para um computador usando o programa WinControl (SILVEIRA et al., 2015).

b.2) Fotossíntese, condutância estomática e transpiração

Plantas de tomateiro submetidas às condições dos ensaios anteriormente descritos para medições do índice SPAD e fluorescência da clorofila foram utilizadas nas análises da taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e transpiração ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). As medições foram realizadas com um sistema portátil para avaliar a fotossíntese de forma não destrutiva por meio de um analisador de gás infravermelho, IRGA, modelo LI-6400 XT (LI-COR). A densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) foi fixada em $1.000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As avaliações foram realizadas em sistema aberto, a concentração ambiente de CO_2 foi cerca de $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$, a umidade relativa do ar durante as avaliações foi de $\approx 80 \pm 5 \%$ e a temperatura foliar variou de $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 4 e 6 dias da aplicação de PSHII (imediatamente antes da inoculação e 48h após o desafio com *X. gardneri*, respectivamente), foram realizadas medições na segunda e terceira folha definitivas localizadas a partir da base das plantas. Duas folhas por planta foram analisadas, sendo que as medições foram feitas na região média de folíolos completamente expandidos, totalizando quatro leituras por vaso e cinco repetições por tratamento.

5.3.3 Aspectos histopatológicos

a) Preparo das amostras

As plantas de tomateiro foram igualmente tratadas com água destilada água ou PSHII ($1,5 \text{ mg/mL}$) e, após 4 dias da aplicação, foi

realizada a inoculação com *X. gardneri* (OD 0,6; 600 nm). As coletas foram realizadas nos tempos 0 (plantas não tratadas), 4, 7 e 10 dias da aplicação de PSHII. Nos diferentes tempos de amostragem, as amostras constituídas de discos foliares de 0,5 cm de diâmetro foram imersas em solução fixadora 1:1 (tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,2 e paraformaldeído 4%) em tubos de 2 mL. Após a coleta, os tubos foram colocados abertos em dessecador a vácuo e o conjunto mantido em geladeira por 24 h. Após o período de fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,2), duas vezes, por 15 minutos em cada troca (BOUZON, 1993). Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em série etílica (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 30 minutos em cada concentração à temperatura ambiente. A pré-infiltração das amostras foi realizada em três passos com misturas de 2:1, 1:1, e 1:2 de etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (Historesin, Leica[®], Alemanha), durante 12 h em cada passo. Posteriormente, o material foi infiltrado em resina pura por 24 h. A inclusão foi realizada na mesma resina em histo-moldes de silicone com adição de polimerizador (para os 3 mL de historesina foram utilizados 200 µL de *hardner*), à temperatura ambiente, por 2 h para endurecer (modificado de ARNOLD et al., 1975). Em seguida, os blocos permaneceram em placas de Petri com sílica, dentro de estufa a 60 °C para manter o material desidratado. As amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de 5 µm foram coletadas com pinça, distendidas sobre gotas de água destilada à temperatura ambiente sobre lâminas de vidro, e secas sobre placa aquecedora a 37 °C por 30 minutos.

b) Detecção de polissacarídeos ácidos e neutros

As lâminas contendo secções das amostras foliares de tomateiro foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos, para registros em microscópio ótico das características morfológicas em relação às observações de polissacarídeos ácidos e neutros.

Para observar polissacarídeos ácidos no mesofilo de tomateiros através da reação de metacromasia (O'BRIEN e MCCULLY, 1981), foi utilizado o corante azul de toluidina - ATO. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução de ATO 0,5% pH 3,0, por 30-60

segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar (GORDON-MILLS e MCCANDLESS, 1973; MCCULLY, 1970). Posteriormente, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

A presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose) foi observada utilizando o método PAS - Ácido Periódico de Schiff. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 20 minutos. Em seguida, foi realizada uma lavagem em água corrente durante 15 minutos. Após isso, as secções foram coradas com reativo de Schiff (200 mL de água destilada; 1.5 g fucsina básica; 9 g bissulfeto de sódio e 10 mL de HCl) por 30 minutos no escuro. Depois da retirada do excesso de corante, as secções foram lavadas em água corrente por 15 minutos, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá (GAHAN, 1984). As observações e registros dos diferentes tratamentos foram feitos em microscópio óptico Leica ® modelo DM 2500 adaptado com sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América).

c) Detecção de compostos fenólicos in situ

As análises foram feitas em microscópio de luz invertida IX-81 Olympus (modelo U-LH100HG, 19V 100W) equipado com sistema de fluorescência U-RFL-T (Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas em câmera Olympus DP71 modelo U-TV0.5XC-3 (Tóquio, Japão), associada a software cellSens 1.7 (Olympus). As lâminas contendo secções foliares das cultivares Santa Cruz Kada e BRS Sena (sem passar por qualquer teste histoquímico) foram analisadas quanto ao acúmulo de compostos fenólicos por epifluorescência. As imagens foram obtidas sob luz UV (excitação de 340 a 380 nm com filtro barreira de 430 nm) ou luz azul (excitação de 450 a 490 nm com filtro barreira de 515 nm) e ajustados os tempos de exposição de 23.85 ms e 8.478 ms para cada filtro de luz.

d) Aspectos anatômicos

Imagens de secções das cultivares Santa Cruz Kada e BRS Sena (coletadas no tempo 0; plantas não tratadas) que receberem as colorações ATO e PAS foram analisadas quanto à espessura total do mesófilo e tamanho de células do parênquima paliçádico. Fotografias (aumento de 400x) de 10 secções por cultivar foram mesuradas em três pontos da imagem para obtenção dos dados de espessura do mesófilo.

Os valores médios de espessura do parênquima paliádico foram obtidos das medidas retiradas de 10 células em cada campo analisado.

Para o cálculo da densidade estomática, porções da epiderme abaxial de folíolos das cultivares Santa Cruz Kada e BRS Sena foram descoladas com auxílio de fita adesiva transparente utilizada para empacotamento. A fita com o fragmento de epiderme aderido foi posicionada em lâmina para microscopia e o registro feito sob microscopia ótica. As microfotografias foram obtidas com auxílio de registros de 20 campos por folha, cada campo de visão com área de $0,10005\text{mm}^2$. Os dados, registrados em planilha eletrônica, foram aplicados à fórmula $D = \text{número de estômatos}/0,10005\text{mm}^2$, para determinação da densidade estomática (D). Cinco folhas de cada cultivar foram analisadas sendo estas as terceiras folhas definitivas localizadas no sentido da base para o ápice da planta.

5.3.4 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA one way ou fatorial) e teste post-hoc de Tukey (comparações múltiplas) foram utilizados para encontrar diferenças significativas entre as variáveis analisadas nos experimentos. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico Statistica 8.0 (<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Efeito de PSHII na interação tomateiro e *X. gardneri*

a) Resistência de cultivares a mancha-bacteriana

Dados relacionados com a severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em diferentes cultivares de tomateiro após 7 e 14 dias da inoculação indicaram diferenças significativas para os fatores tratamento e cultivar, porém sem interação entre os fatores. Houve redução significativa na severidade da doença (%) em plantas tratadas com o polissacarídeo PSHII (1,5 mg/mL) em comparação com plantas

pulverizadas com água. Plantas da cv. Santa Cruz Kada apresentaram os maiores valores médios de severidade enquanto as cultivares Natália e BRS Sena apresentaram menores valores de severidade, não diferindo estatisticamente entre si. No entanto, quando analisado o efeito do tratamento sobre a cultivar de forma isolada, com exceção da cv. Natália na avaliação aos 14 dias ($p=0,043$), o teste t de Student não detectou diferenças significativas entre plantas das diferentes cultivares tratadas ou não com PSHII (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Severidade (%) da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* nas cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou polissacarídeos (1,5 mg/mL) extraídos de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII). Florianópolis, 2015.

Cultivar/Tratamento	Severidade (%)		$\bar{X} \pm DP^*$
	7 dias após inoculação		
	H ₂ O	PSHII	
BRS Sena	3,6±1,9Ba	4,1±2,3Ba	3,8±2,2B
Natália	10,3±4,9ABa	4,5±1,9Ba	7,4±3,1B
Kada	14,3±5,5Aa	10,2±3,3Aa	12,3±4,0A
$\bar{X} \pm DP^*$	9,4±3,3a	6,3±2,7b	

Cultivar/Tratamento	Severidade (%)		$\bar{X} \pm DP^*$
	14 dias após inoculação		
	H ₂ O	PSHII	
BRS Sena	4,2±2,1Ba	3,8±1,9Ba	4,0±2,3B
Natália	11,2±4,3ABa	4,8±3,1Bb	8,0±3,2B
Kada	22,8±11,8Aa	15,1±3,4Aa	18,9±5,0A
$\bar{X} \pm DP^*$	12,7±1,9a	7,9±1,7b	

Letras maiúsculas distintas entre os cultivares e minúsculas entre tratamentos indicam diferenças pelo teste de Tukey a 5% de significância (ANOVA *one way*). Os dados foram transformados raiz quadrada para obter homogeneidade das variâncias (Teste de Levene). DP: desvio padrão da média.

b) Parâmetros relacionados à fotossíntese

O efeito de PSHII sobre as cultivares Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena foi avaliado em função de possíveis alterações em parâmetros relacionados à fotossíntese. Os resultados das medições realizadas com

medidor de clorofila, fluorímetro de luz modulada e analisador de trocas gasosas por infravermelho foram demonstrados a seguir nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente.

b.1) Índice SPAD e Fluorescência da clorofila

Nos dados referentes ao índice SPAD, não foram detectadas diferenças significativas entre plantas tratadas com H₂O e PSHII, porém, as cultivares Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena diferiram significativamente entre si. A cultivar Santa Cruz Kada apresentou os menores valores em todos os tempos analisados, independente da inoculação, enquanto na cv. BRS Sena os valores foram intermediários e a cv. Natália exibiu os maiores valores de índice SPAD. Após a inoculação, diferenças significativas foram encontradas nas análises dos fatores cultivar e inoculação. Aos 2 dpi, plantas de tomateiro inoculadas com *X. gardneri* apresentaram maiores valores nos índices SPAD e as cultivares Kada e Sena não diferiram entre si e alcançaram os menores valores de índice SPAD quando comparadas a cv. Natália. Aos 6dpi, os fatores cultivar e inoculação apresentaram diferenças significativas e interação entre estes dois fatores. Assim, plantas da cv. Santa Cruz Kada apresentaram maiores valores de índice SPAD após inoculação com *X. gardneri* (6 dpi) em relação às plantas não inoculadas desta cultivar (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Índice SPAD das cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou polissacarídeos (1,5 mg/mL) de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) aos 2 e 4 dias após o tratamento - dat (A) ou após 2 e 6 dias da inoculação (correspondente a 6 e 10 dat) com *X. gardneri* (B).

Cultivar/ Tratamento		Índice SPAD (A)					
		2 dias após o tratamento			4 dias após o tratamento		
		H ₂ O	PSHII	$\bar{X} \pm DP$	H ₂ O	PSHII	$\bar{X} \pm DP$
BRS Sena		33,1±1,9	33,0±1,2	33,0±1,5 B	35,3±1,5	34,0±1,0	34,7±1,2 B
Natália	NI	35,7±2,0	36,3±1,0	36,0±1,5 A	38,4±1,3	38,5±1,0	38,4±1,1 A
Kada		27,2±1,7	28,8±1,6	28,0±1,6 C	30,3±0,7	30,4±0,6	30,3±0,6 C
$\bar{X} \pm DP$		31,9±1,8	32,7±1,2		34,6±1,1	34,3±0,8	
Cultivar/ Tratamento		Índice SPAD (B)					
		6 dias após o tratamento (2 dias após inoculação)			10 dias após o tratamento (6 dias após inoculação)		
		H ₂ O	PSHII	$\bar{X} \pm DP$	H ₂ O	PSHII	$\bar{X} \pm DP$
BRS Sena		31,6±1,4	31,2±0,2	31,4±0,8 B	32,7±0,1	32,6±0,5	32,6±0,3 B
Natália	NI	36,2±1,2	37,3±0,7	36,7±0,9 A	36,9±0,4	35,4±0,9	36,1±1,1 A
Kada		29,0±1,3	30,4±1,0	29,7±1,1 C	27,0±1,2	27,0±0,8	27,0±1,0 C
$\bar{X} \pm DP$		32,2±1,3	32,9±0,6		32,2±0,5	31,7±0,7	
BRS Sena		32,0±0,2	32,5±1,6	32,2±0,9 B	32,7±0,4	32,6±0,7	33,6±0,5 B
Natália	I	36,5±0,7	37,2±1,9	36,9±0,8 A	36,9±1,0	35,4±1,3	35,7±1,1 A
Kada		31,5±2,3	31,6±0,6	31,5±0,9 B	27,0±1,5	27,0±1,0	29,9±1,2 C
$\bar{X} \pm DP$		33,3±1,0	33,8±1,3		32,2±0,9	31,7±1,0	

Médias seguidas pela mesma letra (Maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). NI plantas não inoculadas e I inoculadas com *X. gardneri*.

Os resultados dos parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila nos folíolos das cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou PSHII (1.5 mg/mL) e seguidas de inoculação com *X.gardneri* foram demonstrados na Tabela 3.3.

No tempo correspondente aos dois dias após o tratamento (2 dat), para os parâmetros F0 e rendimento do fotossistema II, as análises fatoriais foram significativas para o fator cultivar, e houve interação entre os fatores cultivar e tratamento. Nas plantas da cv. BRS Sena aspergidas com água foram encontrados os menores valores de F0, entretanto, a cultivar demonstrou os maiores valores de rendimento do PSII. Em relação ao parâmetro Fm, somente o fator cultivar apresentou diferenças significativas e os maiores valores foram encontrados nas plantas da cv. Kada (*one way Anova*) em comparação com as cvs. Natália e BRS Sena (Tabela 3.3 A).

Após 4 dias do tratamento, as análises dos parâmetros F0 e Fm revelaram diferenças significativas entre as cultivares, sem efeito dos tratamentos ou interação entre os fatores. Nos resultados de F0 e Fm, a cv. Kada apresentou os maiores valores médios em relação às cvs. Natália e BRS Sena, que não diferiram estatisticamente entre si. Quanto ao rendimento do PSII não foram detectadas diferenças significativas entre as cultivares ou tratamentos (Tabela 3.3 B).

Nos dados coletados 6 dias após o tratamento, as plantas tratadas com PSHII (não inoculadas) apresentaram menores valores de Fm. No parâmetro F0, a cultivar mais suscetível Santa Cruz Kada apresentou maiores valores em relação às cvs. Natália e BRS Sena que não diferiram entre si. No rendimento do PSII, a cv. Santa Cruz Kada apresentou valores intermediários não diferindo significativamente das cvs. Natália e BRS Sena que exibiram os maiores e menores valores respectivamente. As plantas tratadas com PSHII e inoculadas com *X.gardneri* também apresentaram os menores valores nos parâmetros F0 e Fm. Nas plantas inoculadas aos 2dpi, não foram encontradas diferenças significativas entre as cvs. nos parâmetros avaliados F0, Fm e rendimento do PSII (Tabela 3.3 C).

Aos 10 dias após o tratamento em plantas inoculadas ou não com *X.gardneri*, as análises dos valores de F0 e rendimento do PSII indicaram interação e diferenças significativas para os fatores tratamento e cultivar. A análise do parâmetro Fm em plantas não

inoculadas indicou interação entre o fator cultivar e tratamento, porém somente o fator cultivar foi significativo. Plantas da cv. Natália tratadas com PSHII e não inoculadas tiveram valores superiores de F0 e Fm em relação às plantas desta cv. não tratadas. Nas plantas da cv. Kada inoculadas, os valores de F0 nas plantas tratadas com PSHII foram inferiores em relação às testemunhas não tratadas. Nas plantas não inoculadas o rendimento do PSII nas plantas da cv. Kada após o tratamento com PSHII foi reduzido em relação às testemunhas desta cv. Entretanto, nas plantas inoculadas da cv. Kada, o efeito de PSHII foi o oposto e resultou em acréscimos em relação às plantas não tratadas (inoculadas). Nas plantas inoculadas no parâmetro Fm foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (H₂O ou PSHII) e entre as cultivares, mas sem interação entre estes fatores. Ou seja, em plantas inoculadas aos 6 dpi o tratamento com PSHII reduziu F0 enquanto o efeito da cultivar agrupou Santa Cruz Kada e BRS Sena com os maiores valores de F0 diferentes significativamente da cv. Natália com valores menores (Tabela 3.3 D).

b.2) Fotossíntese, transpiração e condutância estomática

Quatro dias após o tratamento, os resultados das taxas fotossintéticas das cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena revelaram diferenças significativas entre as cultivares avaliadas e interação entre os fatores cultivar e tratamento. A taxa fotossintética em plantas das cultivares Kada e Natália pulverizadas com polissacarídeos extraídos a partir de basidiocarpos residuais do cultivo do cogumelo Shiitake foram 22,9 % e 18,6 % superiores a taxa mostrada em plantas pulverizadas com água destilada (controle). Entretanto, a cultivar mais resistente à mancha bacteriana, BRS Sena, apresentou menor taxa fotossintética (18,7 %) nas plantas tratadas com PSHII em relação às plantas controle. Reduções significativas na taxa de transpiração e condutância estomática foram observadas em folhas de diferentes cultivares de tomate aos quatro dias após a pulverização com PSHII (1,5 mg/mL). Os valores de condutância estomática e taxa de transpiração observados nas cultivares Natália e BRS Sena foram cerca de duas vezes maiores que a média dos observados na cultivar mais susceptível Santa Cruz Kada (Tabela 3.4 A).

Aos 6 dias após o tratamento (6 dat), nas plantas não inoculadas, foram detectadas diferenças significativas somente entre as cultivares. A cultivar BRS Sena apresentou valores intermediários de taxa

fotoassintética não diferindo significativamente das cvs. Natália e Santa Cruz Kada que apresentaram os maiores e menores valores respectivamente. Nos dados de condutância estomática e taxa transpiratória houve interação e ambos os fatores cultivar e tratamento apresentaram diferenças significativas. Nas plantas não inoculadas da cv. Natália, o tratamento com PSHII reduziu a condutância estomática e a taxa transpiratória em relação às testemunhas (não inoculadas) desta cultivar. Sobre a taxa fotoassintética de plantas aos 2 dias após a inoculação (2 dpi, que corresponde a 6 dat), os fatores cultivar e tratamento demonstraram diferenças significativas com interação entre estes fatores. Plantas da cv. Natália tratadas com PSHII e inoculadas apresentaram maiores valores de taxa fotoassintética em relação às testemunhas não tratadas e inoculadas desta cultivar. Nos parâmetros condutância estomática e taxa transpiratória foram observadas interações significativas entre os fatores cultivar e tratamento, porém somente o fator cultivar foi significativo. Aos 2 dpi nas plantas tratadas com PSHII e inoculadas com *X.gardneri*, os maiores valores de condutância estomática e taxa transpiratória foram observados para a cv. Natália, enquanto valores inferiores nestes parâmetros foram exibidos nas cvs. BRS Sena e Santa Cruz Kada (Tabela 3.4 B).

Tabela 3.3 Fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm) e rendimento quântico do Fotossistema II (Fv/Fm) nas cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou polissacarídeos (1,5 mg/mL) extraído de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) aos 2 e 4 dat (dias após o tratamento) ou 2 e 6 dpi (dias após a inoculação) com *X. gardneri* (6 e 10 dat).

Cultivar/ Tratamento		2 dias após o tratamento (A)								
		Fluorescência inicial (F0)			Fluorescência máxima (Fm)			RendimentoPSII (Fv/Fm)		
		H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}
Kada	NI	552,1Aa	536,8Aa	544,4	2971,8	2853,1	2912,5A	0,814Ba	0,811Aa	0,813
Natália		520,4Aa	507,9Aa	514,1	2773,6	2775,7	2774,6B	0,812Ba	0,816Aa	0,814
BRS Sena		474,0Ba	505,5Aa	489,2	2792,1	2808,0	2800,1B	0,830Aa	0,820Aa	0,825
\bar{X}		515,4	516,4	*	2846,6	2811,6		0,818	0,816	*
Cultivar/ Tratamento		4 dias após o tratamento (B)								
		Fluorescência inicial (F0)			Fluorescência máxima (Fm)			RendimentoPSII (Fv/Fm)		
		H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}
Kada	NI	505,6	506,4	506,0A	2819,2	2753,0	2786,1A	0,820	0,815	0,818
Natália		490,5	476,9	483,7B	2712,6	2656,9	2684,8B	0,818	0,820	0,820
BRS Sena		475,1	471,2	473,2B	2631,0	2633,7	2632,3B	0,819	0,821	0,820
\bar{X}		490,4	484,9		2721,0	2671,9		0,819	0,818	

Tabela 3.3 Fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm) e rendimento quântico do Fotossistema II (Fv/Fm) nas cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) ou polissacarídeos (1,5 mg/mL) extraído de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) aos 2 e 4 dat (dias após o tratamento) ou 2 e 6 dpi (dias após a inoculação) com *X. gardneri* (6 e 10 dat). Continuação.

Cultivar/ Tratamento		6 dias após o tratamento - 2dpi (C)								
		Fluorescência inicial (F0)			Fluorescência máxima (Fm)			Rendimento PSII (Fv/Fm)		
		H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}
Kada	NI	527,7	526,0	527,0A	2708,8	2589,3	2650,1A	0,803	0,796	0,800AB
Natália		505,2	480,1	492,8B	2596,3	2462,6	2532,2B	0,805	0,804	0,804A
BRS Sena		498,0	501,3	500,6B	2455,1	2449,2	2452,2C	0,797	0,794	0,795B
\bar{X}		510,2	535,3		2585,6a	2500,4b		0,801	0,798	
Kada	I	527,0	505,6	516,3	2714,9	2613,5	2664,2	0,805	0,806	0,806
Natália		538,9	507,3	523,1	2660,6	2549,5	2605,1	0,798	0,800	0,799
BRS Sena		526,0	513,0	519,5	2708,5	2639,7	2674,1	0,805	0,805	0,805
\bar{X}		530,8a	508,3b		2694,7a	2600,9b		0,803	0,804	
Cultivar/ Tratamento		10 dias após o tratamento - 6 dpi (D)								
		Fluorescência inicial (F0)			Fluorescência máxima (Fm)			Rendimento PSII (Fv/Fm)		
		H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}
Kada	NI	540,6Aa	554,6Aa	547,6	2805,1Aa	2861,1Aa	2833,1	0,811Ba	0,802Bb	0,806
Natália		502,9Bb	527,0Ba	514,9	2739,0Bb	2806,7Aa	2772,8	0,816Aa	0,812Aa	0,814
BRS Sena		525,9Aa	518,5Ca	522,3	2848,4Aa	2814,8Aa	2831,0	0,815Aa	0,816Aa	0,815
\bar{X}		523,1	533,3	*	2816,1	2808,9		0,814	0,810	*
Kada	I	566,2Aa	531,0Ab	548,6	2925,5	2834,1	2879,7A	0,806Bb	0,812Aa	0,809
Natália		521,7Ba	513,5Aa	517,6	2765,5	2766,6	2766,0B	0,811Aa	0,814Aa	0,812
BRS Sena		536,6Ba	534,0Aa	535,3	2883,3	2864,6	2874,0A	0,814Aa	0,813Aa	0,813
\bar{X}		541,5	526,2	*	2858,1 ^a	2822,6b		0,810	0,813	*

Médias seguidas pela mesma letra (Maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). *Interação significativa entre os fatores cultivar. Números representam o valor médio de 60 leituras.

Tabela 3.4 Taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e transpiração ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de cultivares de tomateiro tratadas com água destilada (H₂O) ou polissacarídeos extraídos a partir de basidiocarpos residuais do cultivo de Shiitake (PSHII; 1,5 mg/mL), inoculadas (I) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri* (D.O. 0.6; 600 nm). Dados coletados quatro dias após o tratamento (4 dat) ou dois dias após a inoculação (2 dpi) com *X.gardneri* (equivalente a 6 dat).

Cultivar/ Tratamento		4 dias após o tratamento (A)								
		Taxa fotossintética			Condutância estomática			Taxa transpiratória		
		H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}
Kada		17,7Ba	21,7Ba	19,7	37,4	28,9	33,2B	0,131	0,101	0,116B
Natália	NI	29,0Ab	34,4Aa	31,7	85,4	60,5	72,9A	0,296	0,212	0,254A
BRS Sena		26,1Aa	21,2Bb	23,7	64,7	53,1	58,9A	0,224	0,185	0,204A
\bar{X}		24,2	25,8	*	62,5 ^a	47,5 ^b		0,217 ^a	0,166 ^b	
Cultivar/ Tratamento		6 dias após o tratamento - 2 dias após a inoculação (B)								
		Taxa fotossintética			Condutância estomática			Taxa transpiratória		
		H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}	H ₂ O	PSHII	\bar{X}
Kada		7,7	7,5	7,6B	56,8Ba	44,0Aa	49,8	0,201Ba	0,147Aa	0,172
Natália	NI	13,7	10,9	12,3A	148,3Aa	42,4Ab	100,0	0,443Aa	0,130Ab	0,301
BRS Sena		9,6	9,8	9,7AB	64,6Ba	41,6Aa	53,1	0,199Ba	0,127Aa	0,163
\bar{X}		10,4	9,4		91,8	42,7	*	0,286	0,135	*
Kada		11,6Aa	9,7Ba	10,6	77,8Aa	66,6Ba	72,2	0,238Aa	0,208Ba	0,223
Natália	I	13,2Ab	21,5Aa	17,3	118,8Aa	176,8Aa	147,8	0,354Aa	0,514Aa	0,434
BRS Sena		13,0Aa	16,6Aa	14,8	112,1Aa	51,4Ba	81,8	0,346Aa	0,257Ba	0,301
\bar{X}		12,6	15,9	*	102,9	98,3	*	0,313	0,326	*

Médias seguidas pela mesma letra (Maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas indicam diferenças entre as cultivares aos 4dat ou inoculação aos 6dat e minúsculas entre os tratamentos.* Interação significativa entre os fatores analisados de acordo com o teste F ($p < 0,05$). Números representam o valor médio de 60 leituras.

5.4.2 Aspectos histopatológicos

Os aspectos histopatológicos foram avaliados sob microscopia ótica e de fluorescência. As análises realizadas em microscopia ótica utilizando as colorações histoquímicas azul de toluidina e ácido periódico de Schiff foram demonstradas na Figura 3.1. Foi observado um comportamento distinto em relação a cultivar Santa Cruz Kada (suscetível) contrastada com a cultivar BRS Sena (mais resistente) frente à colonização bacteriana no mesófilo foliar. Nas cultivares mais suscetíveis, foram visualizados possíveis adensamentos bacterianos distribuídos de maneira uniforme e intensa no apoplasto, enquanto que na cv. mais resistente foram menos intensos e localizados próximos à periferia das células no interior do mesófilo (indicado por estrelas na figura 3.1, imagens 11, 12, 39 e 40). Nas imagens 39 e 40 (Figura 3.1) referentes às plantas da cultivar BRS Sena não tratadas e após 6 dias da inoculação com *X. gardneri*, observou-se que as células do mesófilo apresentaram proliferação celular intensa próxima ao possível sítio de infecção de modo diferente ao observado para cvs. Natália e Kada. Não foram observados detalhes significativos da ação de polissacarídeos de *L. edodes* sobre as plantas analisadas.

Sob microscópio de fluorescência, buscou-se visualizar o acúmulo de compostos fenólicos em cultivares de tomateiro com diferentes níveis de resistência (Santa Cruz Kada e BRS Sena) à mancha bacteriana após a inoculação com *X. gardneri* (Figura 3.2). As imagens de microscopia de fluorescência demonstraram possíveis acúmulos de composto de defesa na epiderme de folhas de tomateiro da cv. Kada após a utilização do elicitor (PSHII 4 dat) quando comparadas com as plantas controle (H₂O 4dat). Após três dias da inoculação, novamente foram evidenciados estes acúmulos em plantas tratadas com PSHII em relação às plantas controle da cv. Kada. De modo diferente ao observado para a cv. BRS Sena, além das respostas de reforço da camada epidérmica, os possíveis depósitos de compostos fenólicos foram evidenciados no interior do mesófilo (indicados por setas na figura 3.2).

Nas análises relacionadas aos aspectos anatômicos de plantas, a cv. BRS Sena apresentou os maiores valores em relação à cv. Santa Cruz Kada nos parâmetros densidade estomática, espessura do mesófilo e do parênquima paliçádico (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 Densidade estomática (número de estômatos/0,10005 mm²), espessura média do mesófilo (µm) e espessura de células do parênquima paliçádico (µm) em folhas das cultivares Santa Cruz Kada e BRS Sena cultivadas em casa de vegetação em Florianópolis/SC.

Cultivar	Densidade estomática	Espessura do mesófilo	Células paliçádicas
Santa Cruz Kada	136,4±36,1 B	283,3±27,1 B	92,6±14,2 B
BRS Sena	152,2±31,3 A	374,2±23,0 A	124,9±22,1 A

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem significativamente pelo teste F ($p < 0.05$).

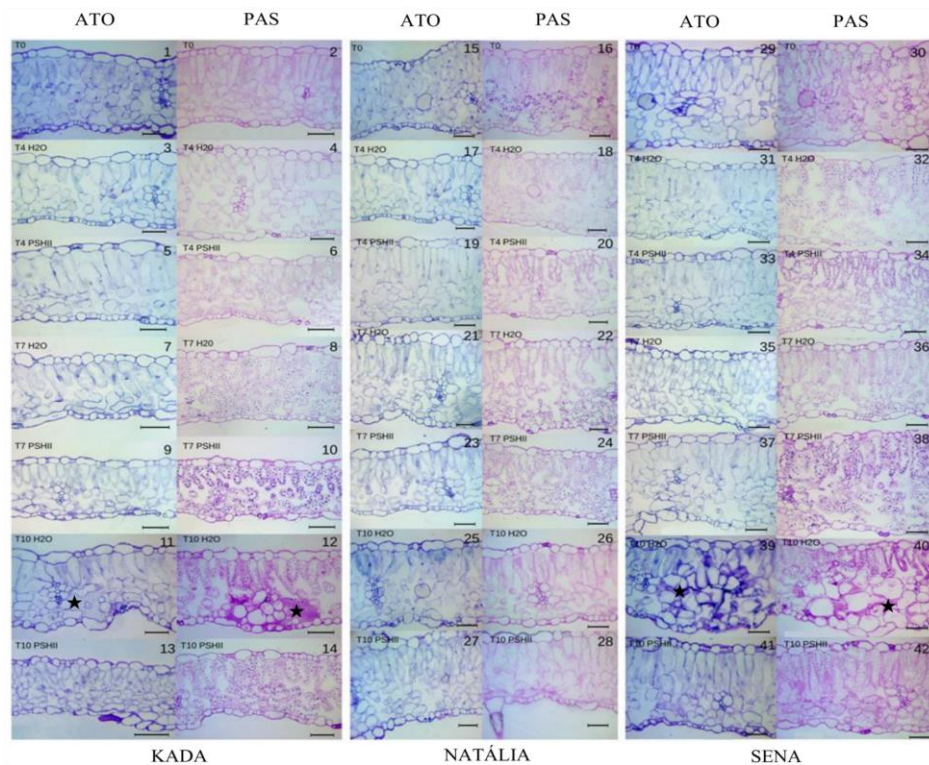


Figura 3.1 Seções transversais de folíolos de tomates das cultivares Santa Cruz Kada (1-14), Natália (15-28) e BRS Sena (29-42) após tratamento com água destilada ou polissacarídeos de basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII), seguidos de inoculação com *X. gardneri* e análise sob microscopia de óptica. Amostras foram coletadas nos tempos 0 (T0), 4 (T4), 7 (T7, equivalente a 3 dias após inoculação) ou 10 dias (T10) após aplicação de PSHII (6 dias após inoculação). Números ímpares demonstram seções coradas com azul de toluidina (ATO) que revela a presença de polissacarídeos ácidos e neutros e nesta as células apresentaram reação metacromática na parede celular. Seções representadas por números pares referem a coloração com ácido periódico de Schiff - PAS que demonstrando a presença de polissacarídeos neutros agregados nos amiloplastos e na parede celular. Adensamentos bacterianos indicados por estrelas nas imagens 11, 12, 39 e 40. Barras de 10 µm.

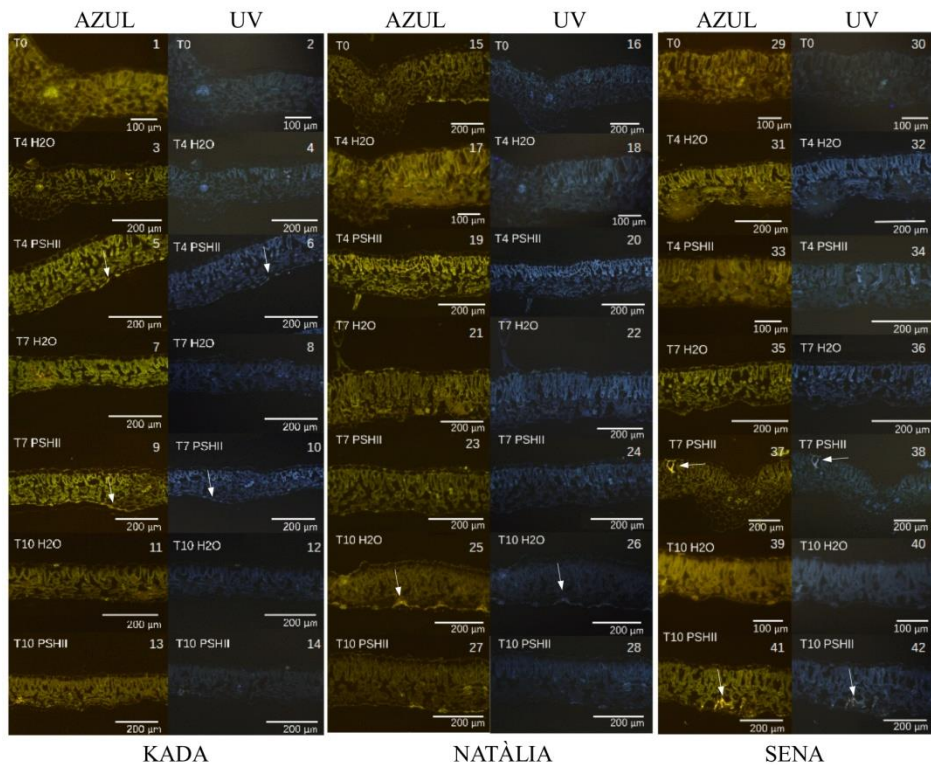


Figura 3.2 Secções transversais de folíolos de tomateiros das cultivares Santa Cruz Kada (1-14), Natália (15-28) e BRS Sena (29-42) após tratamento com polissacarídeos de basidiocarpos residuais do cultivo de *L. edodes* (PSHII), seguidos de inoculação com *X. gardneri* e análise sob microscopia de fluorescência. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 4, 7 (3 dias após inoculação) ou 10 dias após aplicação de PSHII (6 dias após inoculação). Imagens obtidas sob luz UV (números pares) ou luz azul (números ímpares). Setas indicam a presença de compostos fenólicos.

5.5 DISCUSSÃO

Neste estudo, a aplicação de suspensão de polissacarídeos extraídos de basidiocarpos de *L. edodes* (PSHII) reduziu os sintomas causados pela mancha bacteriana em tomateiros suscetíveis. Esta redução pode estar relacionada ao reconhecimento das moléculas de origem microbiana e ativação prévia de mecanismos de defesa da planta, através da resistência induzida.

A resistência induzida vem sendo utilizada para proteger as plantas contra doenças e, neste caso, são utilizados agentes elicitores que ativam diferentes vias bioquímicas de defesa nas plantas dependendo do composto utilizado (Thakur e Sohal 2013). Destaca-se neste estudo a ação de PSHII no controle da mancha bacteriana ocorrido em cultivares de tomate com diferentes níveis de resistência a *Xanthomonas*. De acordo com Trouvelot et al. (2014), existe um interesse crescente dedicado aos carboidratos e seus papéis na imunidade da planta. Alguns deles são elicitores de defesa das plantas enquanto que outras agem como moléculas de sinalização de um modo semelhante a fito hormônios. A percepção de oligossacarídeos tipo PAMPs, MAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados a patógenos, micróbios ou danos, respectivamente) tem fornecido exemplos de eventos de defesa induzida.

O reconhecimento destes padrões pode ocorrer por receptores PRR presentes na célula vegetal. PRRs vegetais são receptores ligados a quinases (RLKs) ou receptor ligado a proteínas (RLPs), que estão localizadas na membrana plasmática e possuem domínio extracelular para reconhecimento de ligantes. Os principais tipos de PRR carregam repetições ricas em leucina (LRR) ou motivo de lisina (LysM), enquanto outros podem levar lectina do tipo C ou ectodomínio EGF. Estes receptores reconhecem unidades de ligações β -1,4 *N*-acetilglucosamina contendo glicanos e aminoaçúcares presentes na superfície microbiana, tais como quitina de fungos e peptidoglicano bacteriano, e lipo-quitooligosacarídeos secretados por micro-organismos (TROUVELOT et al., 2014).

No capítulo anterior, foi detectado um possível efeito direto de PSHII sobre *X. gardneri* devido aos altos teores de compostos fenólicos (antimicrobianos) e a maior capacidade antioxidante (captura de radicais DPPH) observados nesse polissacarídeo. Além disso, a aplicação de

PSHII aumentou a atividade de peroxidases e o teor de compostos fenólicos em tomateiros 4 dias após o tratamento, o que pode ter contribuído para redução dos sintomas da mancha bacteriana.

Neste estudo, aparentemente um efeito físico foi observado 4 dias após o tratamento com PSHII (o que corresponde, nesse experimento, a momentos antes da inoculação das plantas), através de reduções na condutância estomática e na taxa de transpiração nas três cultivares analisadas, além de queda significativa da taxa fotossintética na cv. BRS Sena. Estes resultados podem estar relacionados ao bloqueio de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, em resposta à presença de biopolímeros, em momentos críticos para a penetração bacteriana. Deste modo, a infecção é dificultada e poderia explicar as diminuições dos sintomas da bacteriose em plantas tratadas com polissacarídeos (LUIZ et al., 2016). Por outro lado, o fechamento estomático pode ocorrer pela via de sinalização do ácido salicílico nas células-guarda, mediado pelo peróxido de hidrogênio e a ativação de canais de cálcio (PIE et al., 2000) e, desse modo, não se descarta que PSHII tenha atuado novamente como um elicitador, desencadeando mudanças em um mecanismo estrutural de resistência, ou seja, o fechamento estomático. O horário de abertura dos estômatos, a morfologia da crista cuticular do estômato e a maior densidade estomática podem proporcionar maior resistência a doenças (SILVA et al., 2005).

Para ajudar a esclarecer o modo de ação de PSHII e analisar eventuais danos promovidos pela aplicação do polissacarídeo nas plantas de tomate, entre eles quedas futuras no rendimento, foram estudados parâmetros relacionados com a fotossíntese das plantas. Nas leituras de índice SPAD para as cultivares Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (H₂O ou PSHII). No entanto, foi possível detectar diferenças entre as três cultivares avaliadas e relacionadas à inoculação com *X. gardneri*. Entre as cultivares foram observados acréscimos nos índices SPAD após a inoculação e a mais suscetível à mancha bacteriana (cv. Santa Cruz Kada) apresentou os menores índices SPAD (Tabela 3.3.1 Material suplementar).

O valor ou índice SPAD (*Soil Plant Analysis Development*), obtido com o medidor de clorofila SPAD-502 (Minolta Camera Co., Japão), é uma avaliação não destrutiva dos níveis de clorofila ou enverdecimento da folha positivamente correlacionada ao teor total de clorofila extraível em várias culturas. A gama de aplicação do medidor SPAD na horticultura continua a expandir, tem sido utilizado para avaliar os danos provocados nas plantas e, também se mostrou eficaz na

determinação do status de N no tecido vegetal (SIBLEY et al., 1996). No presente estudo, o medidor SPAD foi eficiente para diferenciações em nível de cultivar. Nos campos experimentais da Embrapa, foi constatada visualmente a coloração verde menos intensa para BRS Sena comparada a outros híbridos de tomateiro industrial que apresentavam cor verde mais acentuada (QUEZADO-DUVAL A.M., comunicação pessoal, 14 de julho, 2016). Esta constatação foi evidenciada no presente trabalho durante as comparações entre os valores SPAD das cultivares BRS Sena e Natália. No entanto, a cultivar Santa Cruz Kada, mais suscetível à mancha bacteriana, apresentou menor índice SPAD em relação à BRS Sena e Natália.

Nos períodos posteriores à inoculação, nas plantas de tomateiro avaliadas no presente estudo, ocorreram alterações nas células do mesófilo como multiplicação celular e acúmulos de compostos de defesa, que podem estar relacionadas a maiores índices SPAD em resposta a infecção bacteriana devido ao aumento da atividade fotossintética nas regiões que circundam o local da infecção. Nos estudos de Berger et al. (2004), a aplicação de imagiologia de fluorescência da clorofila revelou a heterogeneidade espaço-temporal da resposta ao agente patogênico. Após a infecção, acontece inibição do transporte de elétrons da fotossíntese restrita a imediações do local da infecção, cercada por um círculo de aumento da atividade fotossintética que não afeta a fotossíntese no restante da folha. No entanto, quando o índice SPAD for avaliado em períodos mais longos, posteriores à inoculação, provavelmente ocorra um decaimento dos valores em virtude da evolução da doença e interferência de áreas necróticas na folha. Esse quadro foi constatado em plantas de tomateiro após aproximadamente 30 dias da inoculação com *TMV*, que apresentaram reduções nos índices SPAD em relação às plantas não inoculadas (EL-GAWAD e BONDOK, 2015).

Nos resultados dos parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila antes da inoculação, foram observados menores valores de fluorescência inicial (centros de reação do PSII abertos) e fluorescência máxima (centros de reação do PSII fechados) e maiores valores de rendimentos do PSII na cultivar de maior resistência a mancha bacteriana, a cv. BRS Sena. Situação oposta à constatada para a cv. Kada, mais suscetível a *X gardneri* (maiores valores de F0 e Fm e menores valores de rendimentos do PSII). Após a inoculação, houve

aumento da F_m para a cv. Sena. Reduções nos parâmetros F_0 e F_m para as cultivares Kada e Natália foram demonstradas em função do tratamento com PSHII após a inoculação. O tratamento de plantas da cv. Kada com PSHII (1.5 mg/mL) propiciou acréscimos no rendimento do PSII 6 dias após a inoculação com *X. gardneri*.

A infecção causada por *X. gardneri* pode danificar a integridade estrutural da rede de tilacóides, reduzindo a capacidade de transporte de elétrons e fixação de CO_2 . A visualização de alterações decrescentes no rendimento do PSII indica comprometimento da fixação de CO_2 no tecido foliar, sendo um excelente indicador de estresse da planta. Em plantas não estressadas, o valor da relação F_v/F_m medida em folhas normalmente atinge valores de cerca de 0,8 e valores mais baixos podem indicar fotoinibição e danos ao PSII. No entanto, quando são observados aumentos em F_0 , pode ser interpretado como evidência de perdas do PSII, que muitas vezes são irreversíveis. Adicionalmente, acréscimos em F_0 provavelmente estariam relacionados a uma dissipação sem controle de calor e produção de um excesso de energia de excitação e possíveis danos ao PSII (SILVEIRA et al., 2015). É provável que o tratamento com PSHII esteja atuando na redução de danos ocasionados aos aparatos fotossintéticos, visto que houve reduções na F_0 e acréscimos no rendimento do PSII nas plantas da cv. Kada após a inoculação.

Comparando-se as três cultivares de tomate estudado, Sena, a cultivar mais resistente à mancha bacteriana, apresentou os maiores valores nas taxas de condutância estomática, transpiração e fotossíntese no momento de inoculação das plantas. Em termos anatômicos, Sena apresentou maior densidade estomática, e maiores espessuras no mesófilo e nas células do parênquima paliçádico (maior tamanho de células paliçadas). Silva et al. (2005) relatam que genótipos de uma mesma espécie podem apresentar densidade, compactação e espessura da parede das células do parênquima paliçádico diferenciados resultando em diferenças quanto à resistência aos microrganismos. Cultivares com maior número de células, maior índice de compactação e/ou células com paredes mais espessas têm demonstrado maior resistência, como é o caso de Sena em relação à mancha bacteriana. Assim, maiores números de estômatos por área em Sena ajudam a explicar as maiores taxas de condutância estomática, transpiratória e fotossintética das plantas dessa cultivar. Entretanto para Ramos et al. (1992), parte do mecanismo de defesa morfológico da planta contra doenças bacterianas parece estar envolvido com a baixa frequência estomática e uma pequena largura estomatal.

As respostas histopatológicas observadas na cv. Sena provavelmente ocorreram em virtude de reconhecimento prévio do patógeno resultando em acúmulos de compostos antimicrobianos (possivelmente fenólicos devido a autofluorescência destes compostos observada nas imagens de microscopia), os quais foram mais expressivos nas células do interior do mesófilo nesta cultivar em relação às demais cultivares analisadas Natália e Santa Cruz Kada. De acordo com Mott et al. (2014), a planta se prepara para lutar contra a invasão e responde ao detectar um ataque. Uma vez que o patógeno foi detectado pelo sistema imune, a planta responde com moléculas que limitam o crescimento dele e preparam partes distais da planta para a infecção futura. Entre os atuantes no processo de defesa da planta podem ser citados os acúmulos de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, a indução de morte celular programada (muitas vezes é eficaz contra os invasores biotróficos, porém, pode aumentar a susceptibilidade a patógenos necrotróficos) e respostas relacionadas ao estresse oxidativo (presença de espécies reativas de oxigênio e do radical óxido nítrico).

No entanto, os patógenos trabalham paralelamente ao sistema imune para evitar a detecção e manipular a planta para seu benefício. Ao perceber as respostas do hospedeiro, o agente invasor pode lutar no espaço apoplástico através de fatores de virulência, produzir fitotoxinas, causar dano direto às membranas celulares, alterar a expressão genética, inibir funções de proteínas vegetais, imitar hormônios vegetais e induzir a morte celular através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) para resultar em uma infecção bem sucedida (MOTT et al., 2014). Além disso, micróbios invasores podem produzir antioxidantes (ácido ascórbico e glutatona) e enzimas (catalase e superóxido dismutase) para limpar ou desintoxicar ROS (D'HAENZE e HOLSTERS, 2004).

Nas avaliações realizadas em função dos aspectos histoquímicos da interação *X. gardneri* e genótipos de tomateiro, o efeito do tratamento com PSHII pode não ter sido evidenciado. Entretanto, em relação à resistência do genótipo avaliado, a cultivar BRS Sena apresentou reação hipertrófica e hiperplástica nas células do mesófilo acentuada em relação às cvs. Santa Cruz Kada e Natália. A hiperplasia (multiplicação celular) e hipertrofia (aumento no tamanho das células) podem levar à

ruptura da epiderme e liberação bacteriana para a superfície foliar e exterior da planta.

Espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* que habitam as células do apoplasto ou vasos do xilema de plantas podem injetar proteínas efetoras nas células vegetais, através de um sistema de secreção tipo III. Este sistema, também conhecido por efetores do tipo TAL (*Transcription activator-like*), localizam o núcleo da célula vegetal e induzem a expressão de genes alvo específicos. Um dos efetores TAL injetados por *Xanthomonas* em plantas é AvrBs3, que está relacionado à reação de hipertrofia nas células do mesófilo da planta. AvrBs3 induz a expressão de genes reguladores do tamanho da célula, relacionados à produção de auxina e α -expansinas, denominados genes UPA (*upregulated by AvrBs3*). Assim, a proteína AvrBs3 pode provocar a reprogramação do desenvolvimento de células hospedeiras, imitando fatores de transcrição dos eucarióticos, modulando as vias de sinalização para benefício do agente patogênico (Boch e Bonas 2010). As ações destas moléculas efetoras foram relacionadas à facilitação do fluxo de açúcar por induzir a expressão de genes que codificam transportadores de açúcar ou de genes envolvidos na alteração de características de permeabilidade da membrana da célula hospedeira (FATIMA E SENTHIL-KUMAR 2015).

Portanto, efetores do tipo TAL, em espécies de *Xanthomonas*, podem induzir genes alvo em plantas, relacionados ao apoio na proliferação (como estratégia de aquisição de nutrientes) ou dispersão bacteriana. As reações de hipertrofia e hiperplasia também foram associadas com os sintomas do cancro cítrico eliciados nas infecções por *X. citri*. Os cancros induzidos por TAL podem causar ruptura da epiderme e um aumento da liberação bacteriana na superfície da planta, apoiando assim a disseminação de bactérias. Os cancros em citros são induzidos por diversos efetores TAL, presentes em *X. citri*, que direcionam a expressão do fator de transcrição *CsLOB1*, que coordena a formação de pústulas (BOCH et al., 2014). Na cultivar de tomateiro BRS Sena, a bactéria *X. gardneri* deve ter utilizado seus efetores para atingir duas finalidades principais, aquisição de nutrientes para colonizar o apoplasto e liberação dos tecidos para atingir novos nichos, mas ao que tudo indica apenas teve êxito no segundo objetivo.

A presença de polissacarídeos neutros na cv. mais suscetível, Santa Cruz Kada, 6 dias após a infecção com *X. gardneri*, foi identificada através da coloração ortocromática com azul de toluidina e revelada com PAS através de adensamento de células bacterianas (*quorum sense*) no espaço apoplástico próximo a câmara sub estomática.

Fatima e Senthil-Kumar (2015) relatam que patógenos hemibiotróficos obtêm nutrientes da célula hospedeira, exibindo nos estágios iniciais do processo de infecção a fase biotrófica e, em seguida, mudam para a fase necrotrófica. A filosfera é considerada como ambiente hostil para a permanência das bactérias que se acumulam próximo às áreas de lixiviação de nutrientes como estômatos, hidatódios e tricomas glandulares. O espaço apoplástico fornece um ambiente mais protegido para a colonização das bactérias. No entanto, as moléculas localizadas no apoplasto não são facilmente disponibilizadas às bactérias por estarem ligadas às paredes celulares, armazenadas em vacúolos no interior das células vegetais e disponibilidade hídrica reduzida em relação à filosfera. Para sobreviver, o patógeno utiliza-se de estratégias a fim de liberar nutrientes e água para o apoplasto, promovendo a alcalinização durante interações compatíveis, pois um pH baixo pode restringir a multiplicação de bactérias fitopatogênicas.

Contudo, a sobrevivência e permanência da bactéria no apoplasto são dependentes da capacidade do patógeno em escapar de substâncias bactericidas vegetais. Nos aspectos histopatológicos observados através das imagens de microscopia de fluorescência, os depósitos de compostos fenólicos no interior do mesófilo foram evidentes para a cv. BRS Sena, enquanto que para nas cultivares Kada e Natália os acúmulos foram visualizados próximos à epiderme. De acordo com Silva et al. (2005), as paredes de células em torno dos ferimentos podem receber a deposição de substâncias como lignina, suberina e/ou ácidos fenólicos. Depósitos que proporcionam um aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, impedem a difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro ou de nutrientes da planta hospedeira em direção ao patógeno e restringem a colonização por patógenos. Neste sentido, órgãos com menor lignificação tendem a maior susceptibilidade durante a infecção por patógenos. Nos resultados apresentados por Tang et al. (1999), folhas de tomateiro com maior resistência às bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e ao fungo *Cladosporium fulvum* mostraram acúmulos de compostos autofluorescentes, deposição de calose e lignificação.

Os indícios de maior resistência à mancha bacteriana observados neste estudo para a cv. Sena podem ter acontecido devido a fatores genéticos constitutivos somados ao reconhecimento prévio do patógeno

e consequente acúmulo de compostos antimicrobianos em relação às demais cultivares analisadas. Além disso, sugere-se que o patógeno *X. gardneri* possa ter reconhecido previamente o ambiente apoplástico desta cultivar como inóspito e iniciado ação via efetores do tipo TAL para ativar genes relacionados à disseminação bacteriana. A maior resistência da cv. BRS Sena possivelmente esteja relacionada à pressão de seleção advinda de estratégias de melhoramento convencionais desenvolvidas através de seleções e avanço de gerações realizadas em campo experimental da Embrapa Hortaliças. De acordo com Quezad-Duval et al. (2014), as linhagens parentais do híbrido BRS Sena originaram-se de duas populações, direcionadas à obtenção de bons níveis de resistência à mancha-bacteriana e tolerância à begomovirose. As populações foram submetidas a seis ciclos de seleção massal para as características agrônômicas e de processamento industrial.

Ainda como conclusão deste estudo, em virtude do decréscimo da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro, sugere-se que a aplicação de polissacarídeos de resíduo fúngico PSHII pode ser considerada como alternativa aos métodos químicos de controle utilizados convencionalmente. No entanto, estudos futuros podem ser desenvolvidos buscando identificar as rotas de defesa envolvidas. Ainda seria necessário verificar o comportamento desses polissacarídeos a campo e em relação aos aspectos relacionados à produtividade do tomateiro visto que a elicitação de mecanismos de defesa contra *X. gardneri* possa gerar custo fisiológico para a planta.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, E.R.; PEREIRA, R.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; QUEZAD-DUVAL, A.M.; CAFÉ-FILHO, A.C. Sensitivity of xanthomonads causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and in vivo infra-specific competitive ability in *Xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. *Journal of Plant Pathology*, v.94, n.1, p.79–87, 2012. <http://doi.org/10.4454/jpp.fa.2012.004>

ARNOLD, W.; MITRENGA, D.; MAYERSBACH, H. Gefriertrocknung und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA) - ergebnisse histochemischer reaktion. *Acta Histochemistry*, v.14, p.271-277, 1975.

BENHAMOU, N.; NICOLE, M. Cell biology of plant immunization

against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 10, p. 703–719, 1999.

BETT, C.F. *Cultivo artesanal do cogumelo Shiitake: uma potencial atividade para agroecossistemas sustentáveis*. Pato Branco, 2016, 87p. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2016.

BERGER, S.; PAPADOPOULOS, M.; SCHREIBER, U.; KAISER, W.; ROITSCH, T. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum*, v. 122, n. 4, p. 419–428, 2004.

BOCH, J.; BONAS, U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology*, v.48, p.419–436, 2010. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>

BOCH, J.; BONAS, U.; LAHAYE, T. TAL effectors - pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist*, v. 204, n. 4, p. 823–832, 2014.

BOUZON, Z.L. Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales-Rhodophyta). 1993. 66 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1-2, p. 248–254, 1976.

BURKETOVA, L.; TRD, L.; OTT, P.G.; VALENTOVA, O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances*, v.33, n.6, p.994–1004, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.004>

COQUEIRO, D.S.O.; MARASCHIN, M.; DI PIERO, R.M. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism

in tomato plants. *Journal of Phytopathology*, v.159, n.7-8, p.488–494, 2011. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01791.x>

D'HAEZE, W.; HOLSTERS, M. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends in Microbiology*, v.12, p.555–561, 2004. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2004.10.009>

DELGADO, D.Z.; DE FREITAS, M.B.; STADNIK, M.J. Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Crop Protection*, v.47, p.67–73, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.01.003>

DI PIERO, R.M. *Potencial dos cogumelos Lentinula edodes (shiitake) e Agaricus blazei (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos*. Piracicaba, 2003, 157 p. (Tese de Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP. 2003.

DI PIERO, R.M.; WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, n.2, p.175–180, 2006. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822006000200015>

DONOGHUE, J. D.; DENISON, W. C. Commercial production of shiitake (*Lentinula edodes*) using wholelog chip of *Quercus*, *Lithocarpus*, and *Acer*. In: Royse, D.J. (Ed.), *Proceedings of the Second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 1996, University Park, Pennsylvania State University, 1996. p. 265-275.

EL-GAWAD, H.G.A.; BONDOK, A.M. Response of tomato plants to salicylic acid and chitosan under infection with Tomato mosaic virus. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v.15, n.8, p.1520–1529, 2015.

FATIMA, U.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science*, v.6 (setembro), p.1–12, 2015. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00750>

FELIPINI, R.; DI PIERO, R.M. PR-protein activities in table beet

against *Cercospora beticola* after spraying chitosan or acibenzolar-S-methyl. *Tropical Plant Pathology*, v.38 (dezembro), p.534–538, 2013. <http://doi.org/10.1590/S1982-56762013000600009>

GAHAN, P.B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction*. Academic Press. London, 301p. 1984.

GORDON-MILLS, E.M.; MCCANDLESS, E.L.; 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: Harvey, M.J., McLachlan, J. (eds) *Chondrus crispus*. Nova Scotian Institute of Science, Halifax. p.111-133, 1973.

HAHN, M.I.G.; ALBERSHEIM, P. Host-Pathogen Interactions. *Plant Physiology*, v.62, p.107–111, 1978.

JETIYANON, K.; PLIANBANGCHANG, P. Lipopolysaccharide of *Enterobacter asburiae* strain RS83: A bacterial determinant for induction of early defensive enzymes in *Lactuca sativa* against soft rot disease. *Biological Control*, v.67, n.3, p.301–307, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.014>

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature Reviews*, v.444, (novembro), p.323–329, 2006. <http://doi.org/10.1038/nature05286>

LUIZ, C.; FELIPINI, R.B.; COSTA, M.E.B.; DI PIERO, R.M. Polysaccharides From *Aloe Barbadensis* Reduce the Severity of Bacterial Spot and Activate Disease-Related Proteins in Tomato. *Journal of Plant Pathology*, v.94, n.2, p.387–393, 2012. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.046>

LUIZ, C., ROCHA NETO, A.C., DI PIERO, R.M. Induced resistance in tomato leaves against *Xanthomonas gardneri* by polysaccharides from plant or microbial origin. *Journal of Plant Pathology*, v.97, p.119-127, 2015. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I1.029>

LUIZ, C.; SCHAUFFLER, G.P.; LEMOS-BLAINSKI, J.M.; ROSA, D.J.; DI PIERO, R.M. Mechanisms of action of aloe polysaccharides

and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. *Scientia Horticulturae*, v.200, p.170–177, 2016.
<http://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.025>

LIN, C.S.K; PFALTZGRAFF, L.A.; HERRERO-DAVILA, L.; MUBOFU, E.B.; ABDERRAHIM, S.; CLARK J.H.; KOUTINAS, A.; KOPSAHELIS, N.; STAMATELATOU, K.; DICKSON, F.; THANKAPPAN, S.; MOHAMED, Z.; BROCKLESBY, R.; LUQUE, R. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and perspective. *Energy Environmental Science*, v.6, p.426–464, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1039/C2EE23440H>

MCCULLY, M.E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.175, p.702-711, 1970.

MELLO, S.C.; TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.447-448, 1997.

MENG, X.; ZHANG, S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, v.51, p.245–266, 2013.
<http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>

MOSS, W.P.; BYRNE, J.M.; CAMPBELL, H.L.; JI, P.; BONAS, U.; JONES, J.B.; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato using hrp mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biological Control*, v.41, n.2, p.199–206, 2007.
<http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.01.008>

MOTT, G.A.; MIDDLETON, M.A.; DESVEAUX, D.; GUTTMAN, D.S. Peptides and small molecules of the plant-pathogen apoplastic arena. *Frontiers in Plant Science*, v.5, (novembro), n.677, p.1-12, 2014.
<http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00677>

NARUSAKA M., MINAMI T., IWABUCHI C., HAMASAKI T., TAKASAKI S., KAWAMURA K., NARUSAKA Y. Yeast cell wall extract induces disease resistance against bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* crop. *PLoS ONE*, v.10, n.1, p.1–14, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115864>

NEWMAN, M.A.; VON ROEPENACK-LAHAYE, E.; PARR, A.; DANIELS, M.J.; DOW, J.M. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant Journal*, v.29, n.4, p.487–495, 2002. <http://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.00233.x>

O'BRIEN, T.; MCCULLY, M.E. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Temarcarphi Pty Ltda, 1981. 45p.

ORS, M.; SIAH, A.; RANDOUX, B.; SELIM, S.; COULEAUD, G.; MAUMENE, C.; SAHMERS, K.; REIGNAULT, PH.; HALAMA, P. Protection efficacy and modes of action of two resistance inducers on wheat against *Septoria tritici* blotch. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences (maio)*, p.1-8, 2014.

PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A.; PACUMBABA JR, R.O. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. *Plant Disease*, v. 83, p. 20-23, 1999. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.1.20>

PARADA R.Y.; MURAKAMI S.; SHIMOMURA N.; EGUSA M.; OTANI H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. *Journal of Phytopathology*, v.160, p.390-396, 2012.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.417-453.

PEI, Z.M.; MURATA, Y.; BENNING, G; THOMINE, S.; KLUSENER, B.; ALLEN, G.J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic signaling in guard cells. *Nature*, v.406, p.731–34, 2000. <http://doi.org/10.1038/35021067>

PICCININ, E. 2000. Cultivo do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) em toras de eucalipto: teoria e prática. Série Produtor Rural. São Paulo, 48 p.

PIETERSE, C.M.J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S.C.M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009. [http://dx.doi: 10.1038/nchembio.164](http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.164)

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B.W.M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M.L.V.; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo v.13,n.1, p. 277-295, 2005.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CAMARGO, L.E.A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, v.21, n.4, p.670-675, 2003.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE, R. P., JR.; TRUFFI, D.; CAMARGO, L.E.A. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. *Plant Disease*, v.88, p.157-161, 2004. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.157>

RAMOS, L. J.; NARAYANAN, K. R.; MCMILLAN, R. T. Association of stomatal frequency and morphology in *Lycopersicon* species with resistance to *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Pathology*, v. 41, n. 2, p. 157–164, 1992. [http://dx.doi: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02334.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02334.x)

REIS, A.; BOITEUX, L.S. Mancha-deestenfilio: ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. Brasília: *Embrapa Hortaliças*. Circular Técnica 41. 8p. 2006.

SHARMA, K.; BUTZ, A.F.; FINCKH, M.R. Effects of host and

pathogen genotypes on inducibility of resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, v.59, n.6, p.1062–1071, 2010. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02341.x>

SIBLEY, J.L.; EAKES, D.J.; GILLIAM, C.H.; KEEVER, G.J.; DOZIER JR., W.A.; HIMELRICK, D.G. Foliar SPAD-502 meter values, nitrogen levels, and extractable chlorophyll for red maple selections. *HortScience*, v.31, p.468-470, 1996.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Botanica Brasilica*, v.19, n.1, p.183–194, 2005. <http://doi.org/10.1590/S0102-33062005000100018>

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*. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, n. 3, p. 189-196. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000300002>.

SILVEIRA, P.R.; NASCIMENTO, K.J.T.; ANDRADE, C.C.L.; BISPO, W.M.S.; OLIVEIRA, J.R.; RODRIGUES E F.A. Physiological changes in tomato leaves arising from *Xanthomonas gardneri* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.92, p.130-138, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.10.001>

TANG, X.; XIE, M.; KIM, Y.J.; ZHOU, J.; KLESSIG, D.F.; MARTIN, G.B. Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. *The Plant Cell*, v.11, n.1, p.15–29, 1999. <http://doi.org/10.1105/tpc.11.1.15>

THAKUR, M.; SOHAL, B.S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochemistry*, p.1–10, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/762412>

THANARDKIT, P.; KHUNRAE, P.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal*

of Microbiology and Biotechnology, v.18, n.6, p.527-539, 2002.
<http://doi.org/10.1023/A:1016322227535>

TOFFANO, L. *Efeito dos extratos do albedo de Citrus cinensis, Lentinula edodes, Agaricus blazei e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por Saccharomyces cerevisiae no controle da mancha preta dos citros*. Piracicaba, 79 p., 2010. (Tese de Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010.

TONUCCI, N.M. *Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de Lentinula edodes (Shiitake) sobre Colletotrichum sublineolum, Alternaria solani, Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae e Tobacco mosaic virus (TMV)*. Piracicaba, 2004. 87 p. (Dissertação de Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

TROUVELOT, S.; HÉLOIR, M.C.; POINSSOT, B.; GAUTHIER, A.; PARIS, F.; GUILLIER, C.; COMBIER, M.; TRDÁ, L.; DAIRE, X.; ADRIAN, M. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*, v.5, (novembro), n.592, p.1-14, 2014.
<http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00592>

WALTERS, D.R.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, v.64, n.5, p.1263-1280, 2013.
<http://doi.org/10.1093/jxb/ert026>

WANG, J.; WANG, H. Y.; XIA, X. M.; LI, P.P.; WANG, K.Y. Inhibitory effect of sulfated lentinan and lentinan against tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco seedlings. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.61, p.264-269, 2013.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.005>

WHITE, F.F.; POTNIS, N.; JONES, J.B.; KOEBNIK, R. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology*, v.10, n.6, p.749-766, 2009. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00590.x>

ZANARDO, N.M.T.; PASCHOLATI, S.F.; FIALHO, M.B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, p.1499-1503, 2009.

5.7 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 3.3.1. Valores médios de índice SPAD das cultivares de tomateiro Santa Cruz Kada, Natália e BRS Sena após a pulverização de água destilada (H₂O) e polissacarídeos (1,5 mg/mL) de basidiocarpos descartados da produção de *L. edodes* (PSHII) aos 2 e 6 dias após a inoculação (6 e 10 dias após o tratamento) com *X. gardneri*.

Cultivar/ Inoculação	Índice SPAD					
	6 dias após o tratamento			10 dias após o tratamento*		
	NI	I	$\bar{X} \pm DP$	NI	I	$\bar{X} \pm DP$
BRS Sena	31,4±0,9	32,2±1,0	31,8±1,0 B	32,6±0,3 Ba	33,6±0,5 Ba	33,1±0,4
Natália	36,7±1,0	36,9±1,3	36,8±1,1 A	36,1±1,0 Aa	35,7±1,3 Aa	35,9±1,2
Kada	29,7±1,3	31,5±1,5	30,6±1,4 B	27,0±0,9 Cb	29,9±1,2 Ca	28,4±1,0
$\bar{X} \pm DP$	32,6±1,0 b	33,5±1,3 a		31,9±0,7	33,1±1,0	

Médias seguidas pela mesma letra (Maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). *Interação significativa entre os fatores cultivar e inoculação aos 10 dias após o tratamento.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A presente pesquisa permitiu maiores informações sobre o comportamento de cultivares com diferentes níveis de resistência à mancha bacteriana causada por *X. gardneri*. A indução de resistência através do uso de polissacarídeos de resíduos de origem fúngica é uma alternativa potencial de proteção para a cultura do tomateiro.

Foram avaliados diferentes polissacarídeos de resíduos fúngicos, como PRC, PSPO e PSHII, que reduziram significativamente a severidade da mancha bacteriana em tomateiros, independente do intervalo entre a aplicação do tratamento (4 ou 7 dias) e a inoculação com *X. gardneri*. No entanto, PSHII foi a fração mais promissora por apresentar além da ação elicitora, efeito protetor e direto sobre o patógeno *X. gardneri*. O efeito direto de PSHII sobre *X. gardneri*, observado em testes *in vitro*, foi relacionado ao alto conteúdo de compostos fenólicos (antimicrobianos) e maior atividade antioxidante (captura de radicais DPPH) presentes nesta fração. A ação elicitora foi observada em tomateiros suscetíveis (cv. Santa Cruz Kada), onde o tratamento com PSHII ativou mecanismos de defesa, como o aumento na atividade de peroxidases e conteúdo de compostos fenólicos que contribuíram para a redução dos sintomas da mancha bacteriana.

O efeito protetor por formação de película, que dificulta a entrada do patógeno, pode ter sido evidenciado através de quedas nos parâmetros fisiológicos avaliados, como fluorescência inicial, fluorescência máxima, condutância estomática e transpiração, ou ainda estar relacionado ao fechamento estomático como consequência ao reconhecimento do tratamento pela planta. As reduções apresentadas em função do tratamento com PSHII, após a inoculação das cultivares Natália e Santa Cruz Kada com *X. gardneri*, não comprometeram parâmetros importantes relacionados à produção, como a taxa fotossintética e rendimento do PSHII. Os resultados foram favoráveis ao uso de PSHII devido a um melhor status fisiológico em que se encontravam tomateiros tratados inoculados com *X. gardneri* comparados às plantas controles inoculadas.

Em relação às cultivares, a maior resistência à mancha bacteriana observada neste estudo foi constatada nas plantas da cv. BRS Sena. A resistência observada foi relacionada a fatores genéticos constitutivos e adicionalmente a percepção bacteriana precoce, desencadeando acúmulo de compostos antimicrobianos no mesofilo em relação às demais cultivares analisadas. Assim, na cv. BRS Sena, durante infecção por *X. gardneri*, sugere-se que a bactéria possa ter detectado como inóspito o

ambiente apoplástico e ter induzido genes relacionados à disseminação bacteriana via ação de efetores do tipo TAL. Em contraste, na cultivar de maior susceptibilidade Santa Cruz Kada, foi visualizada colonização bacteriana de forma intensa no espaço apoplástico, que evoluem para áreas necróticas e contribuem para os maiores valores de severidade observados.

Em virtude das reduções na severidade da mancha bacteriana em tomateiros, as aplicações de polissacarídeos de resíduos fúngicos podem ser consideradas como alternativas aos métodos químicos de controle. No entanto, a ação desses polissacarídeos a campo deve ser explorada e estudos relacionados a parâmetros de produção de tomateiros devido a possível ativação de mecanismos de defesa poder gerar custos fitofisiológicos. Outro fator a ser considerado refere-se ao resíduo que origina PSHII (basidiocarpos defeituosos da produção de *L. edodes*) ser menos abundante quando comparado aos que deram origem a PRC e PSPO e, reforça a necessidade por um reaproveitamento diferenciado e destinado à geração de produtos com potencial fitossanitário, na busca por maior sustentabilidade na agricultura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAT, B. *Growth of agriculturally important Pseudomonas spp. and Azotobacter chroococcum on beer waste and observation of their survival in peat*. 2006. 96p. (Master of Science in Food Engineering) - Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University. Ankara, 2006. Disponível em: <http://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12607750/index.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2014.

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, 1997, 635p.

AGROFIT. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011, 29 de dezembro. *Agrofit on line*. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit/> Acesso em: 19 jun. 2013.

- ALVARENGA, M.A.R. *Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia*. Lavras, UFLA, 2004. 400 p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. 4. ed. Volume 1 Piracicaba, SP: Ceres, 2011. 704p.
- ANTMANN, G.; ARES, G.; LEMA, P.; LAREO, C. Influence of modified atmosphere packaging on sensory quality of shiitake mushrooms. *Postharvest Biology and Technology*, v. 49, n. 1, p. 164–170, 2008.
- BALBI-PEÑA, M.I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: II. Avaliação in vivo. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 31, n.4 (ago), p.401-404, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000400012>.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente, 2009.341 p.
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, n. 3(set), 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052007000300004>.
- CAMARGO, L.E.A; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIN, L. (Ed.). *Manual de fitopatologia - Princípios e Conceitos*, São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995. p.729-758.
- CARDOSO, M.L.; CONRAD, R.W.; LUZ, M.L.G.S.; LUZ, C.A.S.; GADOTTI, G.I.; GOMES, M.C. Análise econômica dos processos de produção para ampliação de uma microcervejaria em Canela-RS. *Revista Técnico-Científica do CREA-PR*, v.1, p.1-14, 2015.
- CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por Nocardioídes

thermolilacinus. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 33, n. 6, dez, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000600010>.

CHANG, S.T. Global Impact of Edible and Medicinal Mushrooms on Human Welfare in the 21st Century: Nongreen Revolution. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v.1, n. 1, p. 1-7, 1999.

CHANG, S.T. The World Mushroom Industry: Trends and Technological Development. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v.8, n.4, p.297-314, 2006.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.58, n.5, p.582-594, 2002. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0930-y>

COQUEIRO, D.S.O.; DI PIERO, R.M. Antibiotic activity against *Xanthomonas gardneri* and protection of tomato plants by chitosan. *Journal of Plant Pathology*, v. 93, n. 2, p. 337–344, 2011. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v93i2.1188>

COQUEIRO, D.S.O.; MARASCHIN, M.; DI PIERO, R.M. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. *Journal of Phytopathology*, v. 159, n.7-8, p. 488–494, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01791.x>

COSTA, J.R.; ARAÚJO, E.R.; BECKER, W. F.; FERREIRA, M.A.S.V.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. *Tropical Plant Pathology*, v.37, p.149-154, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762012000200009>

DIAS, E.S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 34, n.4, p.795-803, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000400001>.

DI PIERO, R.M. *Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas*

de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Piracicaba, 2003, 157 p. (Tese de Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP. 2003.

DI PIERO, R.M.; WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 169-174. 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000200015>

EIRA, A.F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). In: Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. Mogi das Cruzes, SP, Brazil. Resumos. p.71-81, 2000.

EMBRAPA/SEBRAE. *Catálogo Brasileiro De Hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no País*. Brasília: EMBRAPA. 2010. 59p. Disponível em:
<http://www.sebrae.com.br/setor/horticultura>. Acesso em: 05 jun. 2013.

EMBRAPA. 2012. *BRS Sena, Híbrido Nacional para Processamento*. Embrapa Hortaliças DF. Disponível em:
<http://www.snt.embrapa.br/publico/usuarios/produtos/270-Anexo1.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2013.

FAYOLLE, L.; NOBLE, R.; COVENTRY, E.; AIME, S.; ALABOUVETTE, C. Eradication of *Plasmodiophora brassicae* during composting of wastes. *Plant Pathology*, v.55, p.553-558, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01399.x>

FERREIRA-LEITÃO V.; GOTTSCHALK, L.M.F; FERRARA M.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MOLINARI H.B.C.; BOM, E.P.S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste and Biomass Valorization*, v. 1, n. 1,p.65-76, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-010-9008-8>

FIALHO, M.B. *Efeito in vitro de Saccharomyces cerevisiae sobre Guignardia citricarpa, agente causal da pinta preta dos citros*. Piracicaba, 2004. 60 p. (Dissertação de Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP. 2004.

FAOSTAT, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. Production, Crops, Tomatoes, Brazil. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>> Acesso em: 02 out. 2014.

GARDNER, M. W.; KENDRICK, J. B. Bacterial spot of tomato. *Journal of Agricultural Research*, v.21, p. 123–156, 1921.

GRIMM, E.L. *Previsão da ocorrência de requeima e alternaria em tomateiro industrial irrigado sob duas condições climáticas e seu custo*. Santa Maria, 2010, 97p. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

GOUVEA, A. *Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com Saccharomyces cerevisiae*. Curitiba. 2007. 85p. Tese. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Paraná, 2007.

HAMZA, A.A.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; JOUEN, E.; GAGNEVIN, L.; LEFEUVRE, P.; CHIROLEU, F.; PRUVOST, O. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Disease*, v.94, p.993- 999, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0993>

HARLAN, J.R. *Crops and Man*. American Society of Agronomy, 2 ed. USA, p.225-226, 1992.

HEARST, R.; NELSON, D.; MCCOLLUM, G.; MILLAR, B.C.; MAEDA, Y.; GOLDSMITH, C.E.; ROONEY, P.J.; LOUGHREY, A.; RAO, J.R.; MOORE, J.E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, v. 15, n. 1, p. 5–7, 2009.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2008.10.002>

HESS, D.S.; SILVA, L.A.; FURLAN, S.A.; GERN, R.M.M. Avaliação da produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 cultivado em meio contendo lipídeos. In: *Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal*, v. 7, n. 2, p.21-26, 2006.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Levantamento sistemático da produção agrícola*, Rio de Janeiro v.27, n.11, p.1-86, 2014.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. 2016. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>. Acesso em: maio 2016.

INTERNATIONAL SOLANACEAE GENOMICS PROJECT (SOL). *Status of Solanaceae Crops Research*. SOL White Paper, Part II – Solanaceae Crops, set. 2004. Disponível em: http://solgenomics.net/static_content/solanaceae-project/docs/solanaceae-crop.pdf. Acesso em: 13 mar 2013.

JAIL, N.G.; LUIZ, C.; ROCHA NETO, A.C.; DI PIERO, R.M. High-density chitosan reduces the severity of bacterial spot and activates the defense mechanisms of tomato plants. *Tropical Plant Pathology*, v. 39, n.6, p.434-441, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000600003>

JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p. 323-329, 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05286>

JONES, J.; LACY, G.; BOUZAR, H.; STALL, R.; SCHAAD, N. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, p.755-762, 2004. Disponível em: <http://naldc.nal.usda.gov/download/1006/PDF>. Acesso em: 3 mar 2015.

JORDAN, S.N.; MULLEN, G.J. Spent mushroom compost legislation in Ireland. In: MOLES, R. Proceedings of the 17th Irish environmental researchers colloquium (esai/environ 07), *The Environmental Sciences Association of Ireland*, University of Limerick, p.37-41, 2007.

KALACĚ, P. *Edible mushrooms. Chemical composition and nutritional value*. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 2016. 236p.

KIM, S.H.; OLSON, T.N.; PEPPER, N.D.; NIKOLAEVA, E.V.; PARK, S.; KANG, S. First report of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas gardneri* in Pennsylvania. *Plant Disease*, v.94, n.5, p.638-638, 2010. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0638B>

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIN, L. (Ed.). *Manual de fitopatologia - Princípios e Conceitos*, São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995. p.761-785.

KNAPP, S. On ‘various contrivances’: pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, v. 365, n. 1539, p. 449-460, 2010. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2009.0236>

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biolology*, v.5, p.325–31, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00275-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00275-3)

LUIZ, C.; FELIPINI, R.B.; COSTA, M.E.B.; DI PIERO, R.M., 2012. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease related proteins in tomato. *Journal of Plant Pathology*, v. 94, n. 2, p. 387–393, 2012. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.046>

LUIZ, C.; ROCHA NETO, A.C.; DI PIERO, R.M. Induced resistance in tomato leaves against *Xanthomonas gardneri* by polysaccharides from plant or microbial origin. *Journal of Plant Pathology*, v. 97, p.119-127, 2015. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I1.029>

LEE, J.R.; KIM, S.Y.; CHAE, H.B.; JUNG, J.H.; LEE, S.Y. Antifungal activity of *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase. *BMB reports*, v. 42, p. 281–285, 2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470242>

LEIMER, K.H. Opportunities for Bio-Based Products in the Brazilian Sugarcane Industry. In: *Industrial Biotechnology and Biomass Utilization: Prospects and Challenges for the Developing World. Part II*, United Nations Industrial Development Organization, Viena, p.53-68, 2007.

LIN, C.S.K.; PFALTZGRAFF, L.A.; HERRERO-DAVILA, L.; MUBOFU, E.B.; ABDERRAHIM, S.; CLARK J.H.; KOUTINAS, A.; KOPSAHELIS, N.; STAMATELATOU, K.; DICKSON, F.; THANKAPPAN, S.; MOHAMED, Z.; BROCKLESBY, R.; LUQUE, R. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and perspective. *Energy Environmental Science*, v.6, p.426-464, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1039/C2EE23440H>

MA, X.; LEWIS IVEY, M.L.; MILLER, S.A. First report of *Xanthomonas gardneri* causing bacterial spot of tomato in Ohio and Michigan. *Plant Disease*, v.95, n.12, p.1584-1584, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0448>

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.A.X.; VERDIER, V.; BEER, S.V.; MACHADO, M.A.; TOTH, I.A.N.; SALMOND, G.; FOSTER, G. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v.13, p.614-629, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>

MARÍN-BENITO, J.M.; ANDRADES, S.M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M.J.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.S. Dissipation of fungicides in a vineyard soil amended with different spent mushroom substrates. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.60, p.6936-6945, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf301322h>

MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; MUSUMECI, M.R.; BERETTA, M.J.G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. *Summa Phytopathologica*, v. 2, p. 39-43, 1976.

MOSS, W.P.; BYRNE, J.M.; CAMPBELL, H.L.; JI, P.; BONAS, U.; JONES, J.B.; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato using hrp mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Biological Control, v.41, p.199–206, 2007.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.01.008>

NASCIMENTO, A.R.; FERNANDES, P.M.; BORGES, L.C.; MOITA, A.W.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo.

Horticultura Brasileira, v.31, p.15-24, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000100003>

NAIKA, S; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M; DAM, B.V. *A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização*. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.

ORLEAN, P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, v. 192, n. 3, p. 775–818, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.144485>

OWNLEY, B.H.; WINDHAM, M.T. *Biological Control of Plant Pathogens*. In: TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A.S. *Plant pathology: concepts and laboratory exercises*. Boca Raton: CRC Press, 2004. Chapter 32, p. 554-570.

PARADA, R.Y; MURAKAMI, S.; SHIMOMURA, N; EGUSA, M.; OTANI, H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. *Journal of Phytopathology*, v. 160, p.:390-396, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.11.021>

PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A.; PACUMBABA JR, R.O. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. *Plant Disease*, v. 83, p. 20-23, 1999.

<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.1.20>

PASCHOLATI, S.F. *Potencial de Saccharomyces cerevisiae e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos*. (Tese de Livre-docência). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP. 1998.

PICCININ, E. 2000. Cultivo do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) em toras de eucalipto: teoria e prática. Série Produtor Rural. São Paulo, 48 p.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares em campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.30, n.1, p.5-9, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582005000100001>

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom reduces growth of plant pathogens and leaf spot severity in sorghum. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.68-72, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052010000100012>

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in plant science*, London, v. 4, p. 52-58, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01364-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01364-8)

PONTES, N.C.; OLIVEIRA, J.R.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Defesa ativada. *Cultivar @ Hortaliças e Frutas*, n.64, p. 18-21, out/nov, 2010.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, v.21, p. 400-407, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00193-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00193-8)

QUEZADO-DUVAL, A.M. *Diversidade de Xanthomonas spp. associadas à mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil*. 2003. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE, R. P., JR.; TRUFFI, D.; CAMARGO, L.E.A. *Outbreaks of bacterial spot caused by Xanthomonas gardneri on processing tomato in central-west Brazil*. *Plant Disease*, v.88, p.157-161, 2004. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.157>

QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; LIMA, M.F.; CAMARGO, L.E.A. Diversity of *Xanthomonas* spp.

associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae*, v. 695, p. 101-108, 2005.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; NASCIMENTO A.R.; PONTES N.C.; MOITA A.W.; ASSUNÇÃO, A.; GOLYNSKI, A.; INOUE-NAGATA, A.K.; OLIVEIRA, R.T.; CASTRO, Y.O.; MELO, B.J. Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. *Horticultura Brasileira*, v. 32, n. 4 p.446-452, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620140000400012>

REZENDE, J.A.M.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; BEDENDO, I.; KRUGNER, T.L. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO (Ed.). *Manual de Fitopatologia*, vol.1, Princípios e Conceitos. São Paulo. Agronômica Ceres. 2011. p.37- 58.

ROMEIRO, R.S. *Indução de resistência em plantas a patógenos*. 1999. 46 p. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/indures.pdf>> Acesso em: 30 set 2011.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.) *Interação Planta Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SERTKAYA, A. *Investigation of cytotoxic effect of K5 type yeast killer protein on sensitive microbial cells*. Ankara, 2005. 87p. (Dissertação de Mestrado) Middle East Technical University. 2005.

SHERMAN, F. Getting started with yeast, *Methods in Enzymology*, v.350, p.3-41, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)

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*. *Fitopatologia*

Brasileira, v.32, n. 3, p. 189-196. 2007.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000300002>.

STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 26, p.175-177, 2000.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Extrato de *Ganoderma* sp. induz resistência sistêmica ao oídio do pepino. In: XXIV Congresso Paulista de Fitopatologia, 2001, Piracicaba-SP. *Summa Phytopathologica*, 2001. v. 27. p. 109-110.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Association between lipoxygenase and peroxidase activity and systemic protection of cucumber plants against *Podosphaera xanthii* induced by *Oudemansiella canarii* extracts. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v.114, p. 9-13, 2007.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. *Manejo Ecológico de Doenças de Plantas*. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. v. 1, 293 p.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.10, n.1, p.18-46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.

TACO. *Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP* 4. ed., p.34, Campinas, 2011.

THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, v.485, p.635–641, 2012. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11119>

TOFFANO, L. *Efeito dos extratos do albedo de Citrus cinensis, Lentinula edodes, Agaricus blazei e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por Saccharomyces cerevisiae no controle da mancha preta dos citros*. Piracicaba, 79 p., 2010. (Tese de Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010.

TONUCCI, N.M. *Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de Lentinula edodes (Shiitake) sobre Colletrotrichum sublineolum, Alternaria solani, Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae e Tobacco mosaic vírus (TMV)*. Piracicaba, 2004. 87 p. (Dissertação de Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

URBEN, A.F. *Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada*. 2ed. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 186p.

VANDERPLANK, J. E. *Disease resistance in plants*. New York: Academic Press, 206 p. 1968.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v.36, p.453-483, 1998.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>

VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J.; TRIJSSENAAR, A.; VAN 'T WESTENDE, Y.A.M.; HARTOG, F.; VAN LOON, L.C. Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.10, p.716-724, 1997.
<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.6.716>

VILGALYS, R.; SUN, B.L. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences - USA*, v. 91, p. 4599-4603, 1994.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.16.7832>

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, v. 95, n. 12, p. 1368-1373. 2005.
<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert026>

WEESE, T.L.; BOHS, L.A. Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*, v. 32, n.2, p. 445–463, 2007. <http://dx.doi.org/10.1600/036364407781179671>

WILLIAMS, B.C.; MCMULLAN, J.T.; MCCAHEY, S. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Bioresource Technology*, v.79, p.227-230, 2001.

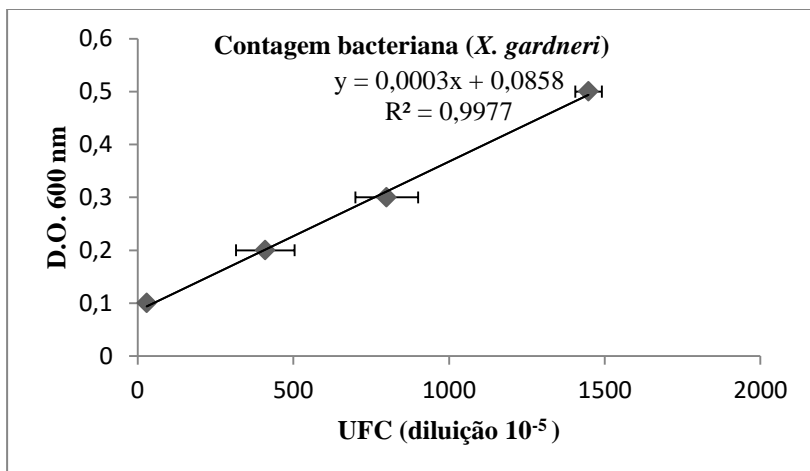
YOHALEM, D.S.; NORDHEIM, E.V.; ANDREWS, J.H. The effect of water extracts of spent mushroom compost on apple scab in the field. *Phytopathology*, v. 86, p.914-922, 1996.

ZANARDO, N.M.T.; PASCHOLATI, S.F.; FIALHO, M.B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, p.1499-1503, 2009.

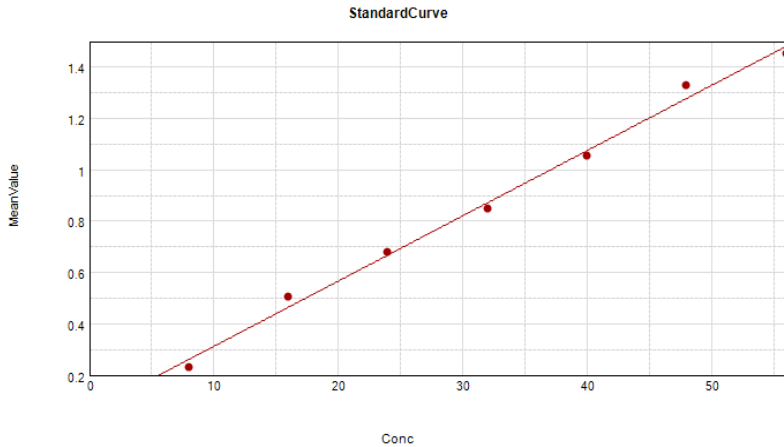
ZANARDO, N.M.T.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO R.M. In vitro antimicrobial activity of aqueous extracts from *Lentinula edodes* isolates against *Colletotrichum sublineolum* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.1, p.13-20, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/1995>

8 APÊNDICES

Apêndice 1. Avaliação do número de unidades formadoras colônias (UFCs).



Apêndice 2. Curva padrão para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (Eixo x =BSA $\mu\text{g/mL}$; eixo y = valores de densidade ótica a 595 nm).



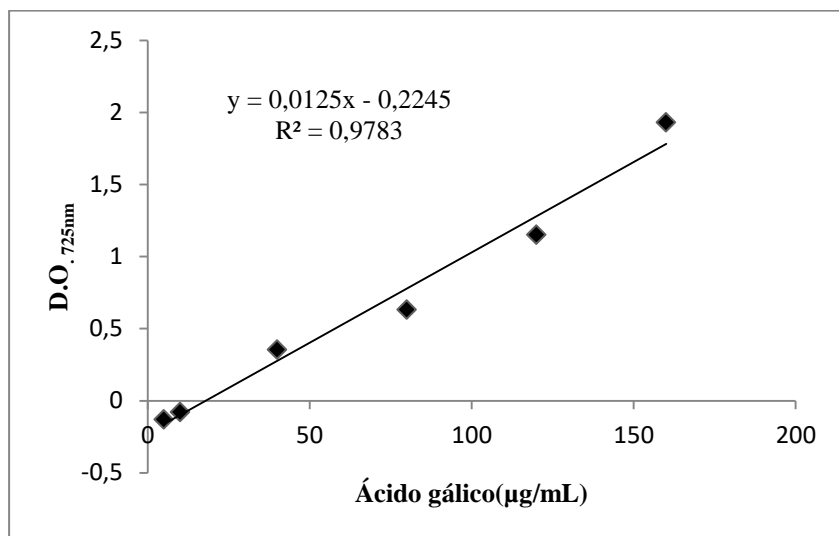
● Std (Standards: MeanVal... vs Conc)

Curve Fit Results ▲

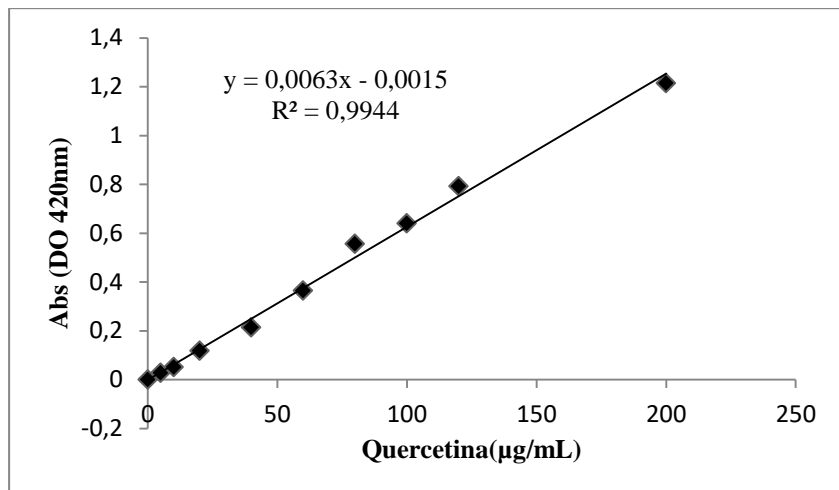
Curve Fit: Linear $y = A + Bx$

	Parameter	Estimated Value	Std. Error	Confidence Interval
Std $R^2 = 0.994$	A	0.059	0.032	[-0.023, 0.140]
	B	0.025	8.83e-4	[0.023, 0.028]

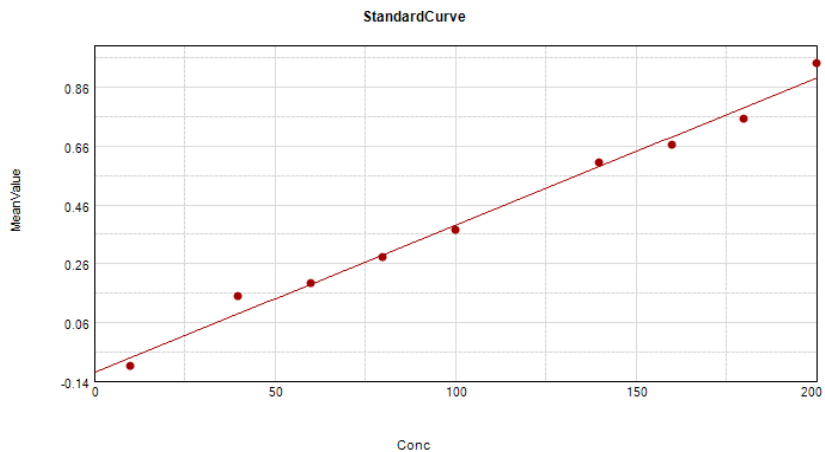
Apêndice 3. Curva padrão para dosagem de compostos fenólicos através do método Folin Ciocalteu.



Apêndice 4. Curva padrão para dosagem de flavonóides.



Apêndice 5. Curva padrão para dosagem de fenilalanina amônia-
liase (Eixo x - ácido *trans*-cinâmico ($\mu\text{g/mL}$) e no eixo os valores de
densidade ótica a 290 nm.



• Std (Standards: MeanVal... vs Conc)

Curve Fit Results ▲

Curve Fit : Linear $y = A + Bx$

	Parameter	Estimated Value	Std. Error	Confidence Interval
Std $R^2 = 0.989$	A	-0.115	0.025	[-0.174, -0.056]
	B	0.005	1.99e-4	[0.005, 0.005]