

Juliane Mendes Lemos Blainski

**EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Lactobacillus plantarum* NA  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA  
MANCHA BACTERIANA**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia e Biociências  
da Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di  
Piero

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis  
2016

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

Blainski, Juliane Mendes Lemos  
EXOPOLISSACARÍDEOS DE LACTOBACILLUS PLANTARUM NA  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA MANCHA  
BACTERIANA / Juliane Mendes Lemos Blainski ; orientador,  
Robson Marcelo Di Piero ; coorientador, Márcio José Rossi.  
- Florianópolis, SC, 2016.  
131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

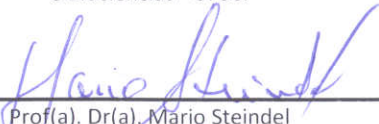
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Respostas de defesa  
da planta. 3. Xanthomonas gardneri. 4. Solanum  
lycopersicum. 5. Bactéria ácido láctica. I. Di Piero,  
Robson Marcelo. II. Rossi, Márcio José. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

**"Exopolissacarídeos de *Lactobacillus plantarum* na indução de resistência em  
tomateiro contra mancha bacteriana"**

Por

**Juliane Mendes Lemos Blainski**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (20/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Mário Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Robson Marcelo Di Piero (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Admir José Giachini (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) José Afonso Voltolini (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Carmen Simioni (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) José Renato Stangarlin (Universidade Estadual do Oeste do Paraná -  
videoconferência)



Dr(a) Alice Maria Quezado Duval (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

Florianópolis, 15 de Julho de 2016.



*Dedico,*

*Aos meus avôs,*

*Maria Aparecida Alamino Mendes, Divino Gonçalves Mendes (in  
memorian),*

*Maria Fracini Lemos, e José Vicente Lemos (in memorian),*

*Aos meus pais,*

*Maria José Alamino Mendes e José Aparecido Lemos*

*“Na simplicidade do conhecimento foram e são exemplos de determinação,  
honestidade, amor e bondade”.*

*Ao meu esposo,*

*Éverton Blainski*

*“Me inspira ser uma pessoa melhor todos os dias e juntos  
não há caminhos que não possamos percorrer...”*



## AGRADECIMENTOS

*Aos que confiaram em mim muito antes do início desta jornada,*

- Meus pais, Maria e José, pelo amor incondicional e por todo sacrifício para que eu continuasse estudando, e meu irmão Thiago, pelo apoio as minhas escolhas e por se alegrar com minhas conquistas. Eu os amo muito!

*Aos que participaram diretamente desta jornada,*

- Meu orientador, prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero, pela acolhida, por todo ensinamento e compreensão;

- Meu co-orientador, prof. Dr. Márcio José Rossi, pelo apoio e idéias novas no início do projeto;

- Aos amigos e colegas do Programa de Pós-graduação, em especial à Luana Souza, Pablo Gressler e Francisco Nascimento, pelas ‘aventuras’ vividas no curso e pelo incentivo para seguir em frente;

- Aos amigos que o LABFITOP me proporcionou, em especial ao Argus C. da Rocha Neto, Caroline Luiz, Tarsis de Aguiar e Daisy Zamira

Delgado, por todas as horas compartilhadas de bancada e por estarem presentes durante o decorrer desta jornada, fazendo com que meus dias fossem mais agradáveis;

- Ao antigo técnico do LABFITOP, Ricardo Felipini, pelos ensinamentos e pelo apoio;

- Aos IC's, Vanessa Laus, Yohanne Rita, Pedro Ometto, Julia Behls, Giana Schauffler, pela ajuda prestada;

- À Ellen Blainski e Jhonata Acácio, por toda a ajuda prestada durante o cultivo dos tomateiros;

- Aos novatos do laboratório que chegaram trazendo 'um novo gás', Juliana Mattana e Paulo Garbugio, pela convivência, por renovar as energias, pelos momentos bons e descontraídos;

- Ao LMBV, em especial ao prof. Dr. Marcelo Maraschin, Dra. Alline Pereira e Dra. Fernanda Ramlov, e Eva Regina Rodrigues, pelo aprendizado, colaboração e por serem sempre prestativos;

- A todos do DMS, em especial aos profs. Dr. Claudio Soares e Dr. Admir Giachini, por cederem espaço na casa de vegetação e no laboratório, pelas dicas e sugestões sempre úteis;

- À pesquisadora Dra. Carla Maísa Camelini, pelo apoio e incentivo;

- Ao LABCEV, em especial à profa. Dra. Zenilda Bouzon por permitir a



utilização dos reagentes e equipamentos e ao Dr. Éder Schmidt, pelo apoio, paciência e ensinamentos;

- Ao pesquisador Dr. José Afonso Voltolini, pelo apoio e pela confiança de emprestar os equipamentos;

- À banca examinadora, pelo apoio técnico-científico;

- À CAPES pelo auxílio financeiro;

- Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, por aceitar meu projeto e me oferecer esta oportunidade;

- À UFSC, pela infraestrutura e pelo apoio para realização deste trabalho;

*Ao que aceitou dividir sua vida comigo, meu amado esposo Éverton, pela presença, pelo carinho, pela compreensão e apoio nos estudos, por tornar minha vida mais leve e bonita e sempre encontrar uma maneira de me fazer sorrir;*

*Ao dono de tudo e que me guia diariamente, Deus, pela minha vida, por todas as graças recebidas, pelo amparo nos momentos difíceis e pelas pessoas de bom coração que colocastes em minha vida.*



*“Ele (Deus) é o dono de tudo.*

*Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar onde cheguei.*

*Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm a oportunidade.*

*Ele a deu pra mim, não sei porque.*

*Só sei que não posso desperdiçá-la.”*

*Ayrton Senna*



## RESUMO

A mancha bacteriana é uma doença de grande importância em plantações de tomate. A produtividade das plantas atacadas por esta fitomoléstia é comprometida principalmente pela redução da área foliar. A aplicação de exopolissacarídeos (EPS) de *Lactobacillus plantarum* pode representar uma forma alternativa de controle de doenças em plantas de tomate. Esse trabalho objetivou avaliar o potencial do EPS de *L. plantarum* para controlar a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas gardneri* em plantas de tomate. Após o crescimento de *L. plantarum* em biorreator, extraiu-se o EPS do meio de cultura livre de células. O EPS foi caracterizado por FTIR e aplicado em plantas de tomateiro (0; 0,5; 1,5 e 3,0 mg mL<sup>-1</sup>), e a inoculação do patógeno foi realizada 3 ou 7 dias depois. Verificou-se também o efeito protetor local e sistêmico do elicitor. *In vitro*, testou-se a atividade antimicrobiana do EPS contra *X. gardneri*. Mecanismos de defesa bioquímicos (teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides, atividade da fenilalanina amônia liase (FAL), lipoxigenase (LOX), glutatona redutase (GR), peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e reação de hipersensibilidade (acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)), alterações fisiológicas (taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, rendimento fotoquímico do fotossistema II e índice SPAD) e morfológicas (microscopia de luz e fluorescência) foram analisados a partir de plantas de tomateiro tratadas com água destilada, EPS (1,5 mg mL<sup>-1</sup>) ou ASM (0,05 mg mL<sup>-1</sup>), inoculadas ou não com *X. gardneri*. Verificou-se redução de mais de 70% na severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro tratadas com o EPS (1,5 mg mL<sup>-1</sup>) em relação à testemunha. O EPS de *L. plantarum* foi capaz de induzir resistência quando aplicado 3 dias antes da introdução do patógeno e apresentou efeito protetor local. *In vitro*, o EPS não apresentou atividade antimicrobiana sobre o agente patogênico. Alterações no perfil espectrofotométrico, na concentração dos ácidos ascórbico e elágico, e na atividade das enzimas FAL, LOX, GR, PFO, CAT e SOD foram observados em plantas tratadas com EPS ou ASM, desafiadas com o patógeno. Observou-se acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células estomáticas e acúmulos celulósicos na epiderme das folhas tratadas com EPS. A taxa fotossintética aumentou nas plantas previamente pulverizadas com EPS e desafiadas com o patógeno, e diferentemente do observado nas plantas tratadas com ASM, o biopolímero reduziu a

condutância estomática e a transpiração dos vegetais. Os parâmetros de rendimento fotoquímico e o índice SPAD não foram alterados com a aplicação do EPS. A aplicação do EPS altera o metabolismo de defesa das plantas e pode ser considerada uma alternativa para o controle da mancha bacteriana. O modo de ação é discutido em termos das alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas em plantas de tomate.

Palavras-chave: *Xanthomonas gardneri* 1. *Solanum lycopersicum* 2. Proteção local e sistêmica 3. Enzimas antioxidantes 4. Parâmetros fisiológicos 5. Bactéria ácido-láctica 6.

## ABSTRACT

Bacterial spot is a disease of great importance in tomato crops. The productivity of plants attacked by this disease is mainly compromised by the reduction in leaf area. The application of exopolysaccharides (EPS) of *Lactobacillus plantarum* may represent an alternative form of disease control in tomato plants. This study aimed to evaluate the potential of EPS from *L. plantarum* to control bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* in tomato plants. After growth of *L. plantarum* in a bioreactor, the EPS was extracted from cell-free culture medium. The EPS was characterized through FTIR and applied to tomato plants (0, 0.5, 1.5 and 3.0 mg mL<sup>-1</sup>) and inoculation of the pathogen was performed 3 or 7 days later. We also tested the local and systemic effect of the elicitor. *In vitro*, we tested the antimicrobial activity of EPS against *X. gardneri*. Biochemical defense mechanisms (phenolics compounds and flavonoids content, PAL, LOX, GR, POX, PPO, CAT, SOD activities and hypersensitivity reaction (accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)), physiological (photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration, photochemical of fotsositema II and SPAD) and morphological (light and fluorescence microscopy) changes were analyzed from tomato plants treated with distilled water, EPS (1.5 mg mL<sup>-1</sup>) or ASM (0.05 mg mL<sup>-1</sup>), inoculated or not with *X. gardneri*. The EPS (1.5 mg mL<sup>-1</sup>) of *L. plantarum* was able to induce resistance when applied 3 days before the introduction of the pathogen and showed effect of local protection. *In vitro*, the EPS did not present antimicrobial activity against the pathogen. Changes in the spectrophotometric profile, ascorbic and ellagic acid concentration and in FAL, LOX, GR, PFO, CAT and SOD activities were observed in plants treated with EPS or ASM and challenged with the pathogen. It was observed accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stomatal cells and alterations in the epidermis of the leaves treated with EPS. The photosynthetic rate increased in the plants previously sprayed with EPS and challenged with the pathogen, and different from that observed in the plants treated with ASM the biopolymer was able to reduce stomatal conductance and transpiration rates of plants. The photochemical performance parameters and the SPAD index didn't change with the application of EPS. The application of EPS triggered the defense metabolism of tomato plants and can be an alternative to protect plants against bacterial spot. The mode of action is discussed in terms of physiological, morphological and biochemical changes in tomato plants.

Keywords: *Xanthomonas gardneri* 1. *Solanum lycopersicum* 2. Local and systemic protection 3. Antioxidant enzymes 4. Physiological parameters 5. Lactic acid bacteria 6.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sintomas iniciais da mancha bacteriana em tomateiro causada por *Xanthomonas gardneri*. .....33
- Figura 2** - Espectro de infravermelho do EPS de *Lactobacillus plantarum*, na região de 4.000-400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas com KBr.....68
- Figura 3** - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro tratadas com EPS de *Lactobacillus plantarum* (0; 0,5; 1,5 e 3,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ) 3 dias antes da inoculação do patógeno ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ ). A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 9 e 18 dias após a inoculação (1ª e 2ª avaliação). Observou-se efeito significativo de doses de acordo com o teste F ( $p < 0,05$ )..... 69
- Figura 4** - Perfil espectrofotométrico do extrato etanol-tolueno de plantas de tomateiro aos 3 (A), 5 (B) e 7 dias (C) após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.....72
- Figura 5** - Cromatograma representativo de compostos fenólicos em folhas de tomateiro obtido por HPLC (coluna de fase inversa e detector espectrofotométrico de UV-visível;  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) com fase móvel  $\text{H}_2\text{O}$  pH3: MeOH PA (85:15, v/v). (1) ácido ascórbico e (2) ácido elágico..75
- Figura 6** - Microscopia de luz de secções transversais de folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos (dat) com água (a,d,g), EPS de *Lactobacillus plantarum* (1,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (b,e,h,i), ou ASM (Acibenzolar-S-Metil; 0,05  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (c,f,j), e inoculadas com *Xanthomonas gardneri* ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ ) aos 3 dat. Amostras coradas com ácido periódico de Schiff (PAS)..... 113
- Figura 7** - Microscopia de luz de secções transversais de folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos (dat) com água (a,d,g), EPS de *Lactobacillus plantarum* (1,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (b,e,h,i), ou ASM (Acibenzolar-S-Metil; 0,05  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (c,f,j), e inoculadas com

*Xanthomonas gardneri* ( $DO_{600nm} = 0,6$ ) 3 dat. Amostras coradas com safranina..... 114

**Figura 8** - Fotomicrografias de folhas de tomateiro aos 7 dias após os tratamentos com água ou EPS de *Lactobacillus plantarum* ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), inoculadas com *Xanthomonas gardneri* ( $DO_{600nm} = 0,6$ ). Amostras coradas com 3,3 – diaminobenzidine (DAB)..... 115

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro submetidas a diferentes intervalos de tempo (3 e 7 dias) entre aplicação de EPS de *Lactobacillus plantarum* ou ASM (Acibenzolar-S-Metil) e a inoculação com *Xanthomonas gardneri* ( $DO_{600nm}=0,6$ ). Avaliações realizadas 15 dias após inoculação..... 70
- Tabela 2** - Efeito do EPS de *Lactobacillus plantarum* incorporado ao meio de cultura ou adicionado em discos de antibiograma sobre o crescimento de *Xanthomonas gardneri*. Avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano após 48 h de incubação..... 71
- Tabela 3** - Valores médios de absorvância na faixa entre 285-325 nm e 640-680 nm em plantas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após o tratamento (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*..... 73
- Tabela 4** - Teor de compostos fenólicos e de flavonoides em plantas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.....74
- Tabela 5** - Concentração de ácido ascórbico e ácido elágico determinado por HPLC em folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*..... 77
- Tabela 6** - Atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) em folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*..... 78
- Tabela 7** - Atividade da glutatona redutase (GR) em folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de

*Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.....79

**Tabela 8** - Atividade de lipoxigenase (LOX) em folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*..... 80

**Tabela 9** - Avaliação da proteção local (A) e sistêmica (B) de plantas de tomate contra a mancha bacteriana a partir da aplicação de EPS de *Lactobacillus plantarum*, ASM ou água, aos 3 dias antes da inoculação com *X. gardneri* ( $DO_{600\text{nm}} = 0,6$ ). A severidade da doença foi avaliada aos 7, 15 e 21 dias após a inoculação das plantas (DAI). ..... 105

**Tabela 10** - Atividade de peroxidases (POX), polifenolxidasas (PFO), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* ( $1,5\text{ mg mL}^{-1}$ ), ASM (Acibenzolar-S-Metil;  $0,05\text{ mg mL}^{-1}$ ) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com a *Xanthomonas gardneri* ( $DO_{600\text{nm}} = 0.6$ ). ..... 107

**Tabela 11** - Taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), transpiração (E) e índice de clorofila (Índice SPAD) de folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* ( $1,5\text{ mg mL}^{-1}$ ), ASM (Acibenzolar-S-Metil;  $0,05\text{ mg mL}^{-1}$ ) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com a *Xanthomonas gardneri* ( $DO_{600\text{nm}} = 0.6$ )..... 109

**Tabela 12** - Análise do rendimento quântico do fotossistema II (Y), fluorescência mínima (F0), fluorescência máxima (Fm) e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) em folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* ( $1,5\text{ mg mL}^{-1}$ ), ASM (Acibenzolar-S-Metil;  $0,05\text{ mg mL}^{-1}$ ) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com a *Xanthomonas gardneri* ( $DO_{600\text{nm}} = 0.6$ )..... 111

**Tabela 13** - Número de células estomáticas com acúmulo de peróxido de hidrogênio/cm<sup>2</sup> na face abaxial de folhas de tomate tratadas com EPS de *Lactobacillus plantarum* ( $1,5\text{ mg mL}^{-1}$ ), ASM (Acibenzolar-S-Metil;

0,05 mg mL<sup>-1</sup>), ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri* (DO<sub>600nm</sub>= 0,6)..... 116

**Tabela 14** - Esquema geral dos efeitos da aplicação de EPS de *Lactocabillus plantarum* e ASM (Acibenzolar-S-Metil) sobre compostos relacionadas à defesa vegetal e parâmetros fisiológicos do tomateiro, aos 5 ou 7 dias após os tratamentos (dat), em plantas inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*. ..... 130



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>APX</b>	Ascorbato Peroxidase
<b>ASM</b>	Acibenzolar-S-Metil
<b>BAL</b>	Bactérias ácido lácticas
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DAI</b>	Dias Após Inoculação
<b>DAT</b>	Dias Após Tratamentos
<b>DFFFA</b>	Densidade de Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos
<b>DO</b>	Densidade Ótica
<b>EPS</b>	Exopolissacarídeos
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FAL</b>	Fenilalanina Amônia Liase
<b>FAO</b>	Food And Agriculture Organization of the United Nations
<b>FM</b>	Fluorescência Máxima
<b>FTIR</b>	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy
<b>F0</b>	Fluorescência Mínima
<b>GRAS</b>	Generally Recognized As Safe
<b>GR</b>	Glutathione Redutase
<b>GSH</b>	Glutathione Reduzida
<b>GSSG</b>	Glutathione Dissulfeto ou Glutathione Oxidada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IR</b>	Indução de Resistência
<b>LOX</b>	Lipoxygenase
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados a Microrganismos
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>O<sub>2</sub></b>	Ânion Superóxido
<b>PAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<b>PAS</b>	Ácido Periódico de Schiff
<b>PFO</b>	Polifenoloxidase
<b>PRP</b>	Proteínas Relacionadas a Patogenicidade
<b>PRX</b>	Peroxiredoxina
<b>RH</b>	Reação de Hipersensibilidade
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>SPAD</b>	Soil Plant Analysis Development
<b>UI</b>	Unidades Internacionais
<b>USFA</b>	United States Food and Drug Administration
<b>UV</b>	Ultravioleta

**Y(II)**      Rendimento Quântico do Fotossistema II



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
Objetivo Geral.....	29
Objetivos Específicos.....	29
<b>CAPÍTULO 1. Caracterização do patossistema e medidas alternativas de controle de doenças em plantas.....</b>	<b>31</b>
1.1. A Cultura do tomateiro.....	31
1.2. A Mancha bacteriana.....	32
1.3. Indução de resistência e os mecanismos de defesa.....	34
1.4. Polissacarídeos e MAMP's no controle de doenças de plantas.....	39
1.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	41
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
<b>CAPÍTULO 2 - Exopolissacarídeos de <i>Lactobacillus plantarum</i> alteram as rotas do ácido salicílico e ácido jasmônico em tomateiro e promovem o controle da mancha bacteriana.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
2.2.1. Obtenção e caracterização do EPS de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	61
2.2.2 Obtenção, multiplicação e manutenção do patógeno.....	61
2.2.3 Avaliação da severidade da doença.....	62
2.2.4 Atividade antimicrobiana.....	63
2.2.5 Análises bioquímicas.....	63
2.2.5.1 Varredura espectrofotométrica de plantas de tomateiro tratadas com EPS de <i>L. plantarum</i> .....	64
2.2.5.2 Teor de compostos fenólicos e flavonoides.....	64
2.2.5.3 Análise de cromatografia dos compostos fenólicos (HPLC).....	65
2.2.5.4 Determinação da atividade de fenilalanina amônia liase.....	65
2.2.5.5 Atividade de glutationa redutase e lipoxigenase.....	66
2.6. Análise estatística.....	67
<b>2.3. RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
2.3.1 Caracterização do EPS.....	68
2.3.2 Efeito do EPS sobre a severidade da mancha bacteriana.....	69
2.3.3 Determinação do intervalo de tempo.....	70
2.3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do EPS.....	70
2.3.5 Perfil espectrofotométrico.....	71
2.3.6 Teor de compostos fenólicos e flavonoides.....	73

2.3.7 Análise de cromatografia de compostos fenólicos (HPLC).....	74
2.3.8 Atividade de fenilalanina amônia liase.....	77
2.3.9 Atividade de glutatona redutase e lipoxigenase.....	78
<b>2.4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
<b>CAPÍTULO 3 - Exopolissacarídeos de <i>Lactobacillus plantarum</i> protegem plantas de tomateiro contra mancha bacteriana por induzirem alterações bioquímicas e fisiológicas.....</b>	<b>93</b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>97</b>
3.2.1 Condições de cultivo do tomateiro e manutenção do patógeno..	97
3.2.2 Obtenção e caracterização do EPS de <i>Lactobacillus plantarum</i> ..	97
3.2.3 Indução de proteção local e sistêmica contra a mancha bacteriana.....	98
3.2.4 Amostragem para análises bioquímicas, fisiológicas e morfológicas.....	99
3.2.4.1 Atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, superóxido dismutase e catalase.....	99
3.2.4.2 Taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, índice SPAD e rendimento fotoquímico do fotossistema II.....	101
3.2.4.3 Microscopia de luz e fluorescência.....	102
3.2.4.4 Reação de Hipersensibilidade.....	102
3.2.5 Análise estatística.....	103
<b>3.3. RESULTADOS.....</b>	<b>104</b>
3.3.1 Proteção local e sistêmica sobre a severidade da mancha bacteriana.....	104
3.3.2 Atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, superóxido dismutase e catalase.....	105
3.3.3 Taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, índice SPAD e rendimento fotoquímico do fotossistema II.....	107
3.3.4 Microscopia de luz e fluorescência.....	112
3.3.5 Reação de hipersensibilidade.....	114
<b>3.4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>117</b>
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>129</b>

## INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma hortaliça de grande importância na alimentação humana, rico em sais minerais, vitaminas e açúcares solúveis. Atualmente está entre as hortícolas mais produzidas e consumidas no mundo, possuindo um papel de destaque principalmente na agricultura familiar (GIAVANELLI e PARADISO, 2002; FAO, 2014; AGRIANUAL, 2015).

Por ser uma planta originária da América do Sul, encontrada desde o litoral até altitudes elevadas, adapta-se a quase todos os tipos de clima existentes. Possivelmente por isso, o tomateiro é acometido por uma vasta gama de fitopatógenos, capazes de causar consideráveis reduções na produtividade e na qualidade do tomate. Dentre as doenças do tomateiro, a mancha bacteriana, causada por espécies de *Xanthomonas*, constitui-se em uma das principais doenças bacterianas foliares. Os danos causados por tais bactérias são intensos em condições favoráveis, podendo chegar a 100% de perda da área foliar (QUEZADO-DUVAL, 2004).

Atualmente, produtos químicos são muito utilizados para o controle de doenças na agricultura, trazendo efeitos benéficos aos produtores a partir do uso racional em curto prazo. Por outro lado, a longo prazo, a aplicação recorrente gera vários problemas devido à seleção de isolados resistentes ao ingrediente ativo, além da poluição causada pelos resíduos dessas substâncias e intoxicação crônica pelo uso contínuo das mesmas (SILVA e FAY, 2006). Especificamente para a mancha bacteriana do tomateiro, o controle é realizado com antibióticos agrícolas e produtos à base de cobre, tendo essas eficiência variada, tornando o controle da doença ainda mais difícil (ROBERTS et al., 2008; FAYETTE et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013).

Nesse sentido, o controle alternativo ao uso de produtos químicos torna-se uma necessidade, agrupando diferentes medidas de proteção das plantas contra as doenças, como o controle biológico e a indução de resistência em plantas. Na indução de resistência, agentes externos são utilizados como elicitores para ativar genes que codificam diferentes respostas de defesa como: proteínas relacionadas à patogênese (glucanases e quitinases); enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas; acúmulo de compostos estruturais (lignina, calose e extensinas) em tecidos próximos ao local de penetração do fitopatógeno, entre outros

(DI PIERO et al., 2005; STANGARLIN et al., 2010; SALAZAR et al., 2013).

Na busca por alternativas que possam ser integradas ao manejo de doenças de plantas, polissacarídeos extraídos de microrganismos chamam a atenção por se constituírem em uma importante classe de substâncias bioativas. De maneira geral, esses polissacarídeos já são utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica. Dependendo da sua estrutura química (composição monomérica, posição das ligações entre os monômeros e a configuração das ligações), são utilizados como agentes emulsificantes, estabilizantes, ligantes, gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filmes, espessantes e suspensores. Dentre os polissacarídeos capazes de induzir respostas de defesa destacam-se os oligossacarídeos de  $\beta$ -glucanas, as quitinas, as quitosanas e os exopolissacarídeos excretados por bactérias (GERN et al., 2008; WANG et al., 2008).

Diferentes tipos de endo e exopolissacarídeos (EPSs) são sintetizados por fungos e bactérias dos gêneros *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Rhizopus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Lactobacillus*, com diferentes atividades biológicas relatadas na literatura. Por exemplo, as bactérias do gênero *Lactobacillus*, particularmente a espécie *L. plantarum*, produzem naturalmente EPS em abundância e este é considerado como importante probiótico para a saúde humana, não é tóxico ao meio ambiente e apresenta potencial de induzir resistência em plantas contra fitopatógenos pela possibilidade de ser identificado pela célula vegetal como MAMP's (padrões moleculares associados a microrganismos) (GERN et al., 2008).

Além disto, bioprocessos conduzidos com microrganismos, em geral, apresentam baixo custo de produção e baixo impacto ambiental. Sendo assim, o processo com microrganismos tem uma visão tecnológica com potencial de mercado devido à possibilidade do controle apurado do processo de produção, possibilitando ter uma matéria-prima de qualidade e de rápida obtenção, estável, padronizada e com reprodutibilidade de propriedades físico-químicas, sem prejuízos ambientais (BAQUE et al., 2012).

Dessa forma, este trabalho objetiva avaliar o potencial do EPS de *Lactobacillus plantarum* na indução de mecanismos de defesa visando o controle da mancha bacteriana do tomateiro.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar o efeito e o modo de ação de exopolissacarídeos de *Lactobacillus plantarum* na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas gardneri*.

### Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito dos EPS de *L. plantarum* no controle da mancha bacteriana do tomateiro;
- Avaliar o efeito antimicrobiano dos EPS *L. plantarum* contra *X. gardneri*;
- Quantificar a atividade de fenilalanina amônia liase, glutationa redutase, lipoxigenase, peroxidase, polifenoloxidase, superóxido dismutase, catalase e o teor de compostos fenólicos e flavonoides relacionados à resistência do tomateiro tratado com EPS de *L. plantarum*, inoculadas ou não com *X. gardneri*;
- Verificar alterações nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em tomateiro tratado com EPS de *L. plantarum*, inoculadas ou não com *X. gardneri*;
- Realizar avaliações histoquímicas em tomateiro tratadas com EPS de *L. plantarum*, inoculadas ou não com *X. gardneri*.



## **CAPÍTULO 1. Caracterização do patossistema e medidas alternativas de controle de doenças em plantas**

### **1.1. A Cultura do tomateiro**

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma planta pertencente à família das solanáceas, perene, herbácea, cultivada como anual, de porte arbustivo e raiz pivotante. É um vegetal que pode desenvolver-se de forma rasteira, semiereta ou ereta, em condições climáticas variáveis. As plantas são autógamas, de flores hermafroditas, cuja fecundação cruzada ocorre com frequência menor que 5%. Seu centro de origem está na América do Sul, mais especificamente de regiões entre o Equador e o norte do Chile, porém sua domesticação ocorreu, primeiramente, por antigas civilizações do México. Esta planta foi introduzida na Europa na primeira metade do século XVI, sendo disseminada posteriormente para as regiões da Ásia, África e Oriente Médio. No Brasil, foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX, porém foi somente após a primeira guerra mundial que houve um expressivo aumento em sua propagação e consumo (PAZINATO e GALHARDO, 1997; ALVARENGA, 2004; NAIKA et al., 2006).

Durante muitos anos o tomateiro foi considerado uma espécie venenosa, especialmente devido à presença de alcalóides tais como a tomatina. No tomate, embora estes compostos estejam presentes em altas concentrações nas folhas e frutos verdes, transformam-se em compostos inertes em frutos maduros (ALVARENGA, 2004). Por outro lado, de acordo com Giavanelli e Paradiso (2002), 100 g do fruto apresentam cerca de 0,9 g de proteínas, 94,1 g de água, 0,1 g de gorduras e 3,5 g de hidratos de carbono que podem fornecer de 15-20 calorias, 500-1500 UI de vitamina A, 20-25 mg de vitamina C, 0,02 mg de riboflavina, 0,6 mg de niacina, 0,1 mg de tiamina, 6-9 mg de cálcio e 0,1- 0,3 mg de ferro. Devido aos seus altos teores nutritivos, o tomate tem ganhado relevância no âmbito da nutrição humana.

Em termos econômicos, o tomate é um dos produtos hortícolas mais comercializados no mundo. Segundo dados da FAO, o tomate para consumo in natura foi a segunda principal hortaliça produzida no mundo em 2012. O Brasil, atualmente, é o oitavo produtor mundial de tomates, sendo destaque na economia como fonte geradora de empregos em sua cadeia produtiva, cultivado praticamente em todos os Estados, destacando-se as regiões Sudeste e Centro-Oeste. Em 2014 foram

produzidos cerca de 18 milhões toneladas de hortícolas, sendo que a cultura do tomateiro sozinha representou mais de 4 milhões de toneladas de frutos colhidos, quase um quarto do total da produção (ORDÓÑEZ-SANTOS et al., 2009; ABCSEM, 2014; FAO, 2014; AGRIANUAL, 2015).

Apesar de todo potencial que a cultura apresenta, o tomateiro exige muitos cuidados, pois pode ser acometido por diversas doenças que restringem a sua produtividade, dependendo do nível de resistência genética que a cultivar apresenta. Mesmo com o desenvolvimento de novas tecnologias, ainda é um dos setores agrícolas que mais consome produtos fitossanitários, com gasto médio de R\$ 4.000,00/ha/ano (AGRIANUAL, 2015).

Dentre as principais doenças foliares do tomateiro, a mancha bacteriana causada por espécies de *Xanthomonas* se destaca, trazendo grandes prejuízos aos produtores, principalmente em períodos chuvosos e quentes, uma vez que a água livre favorece a disseminação do fitopatógeno, assim como a infecção e a colonização das plantas, atingindo reduções da produtividade acima de 50 % (QUEZADO-DUVAL e LOPES, 2005; QUEZADO-DUVAL et al., 2007).

## 1.2. A Mancha bacteriana

A mancha bacteriana do tomateiro foi relatada pela primeira vez na África do Sul em 1920 por Doidge, e o agente causal foi identificado como *Bacterium vesicatorium*. Desse ponto em diante, vários pesquisadores passaram a estudar a doença, identificando o fitopatógeno diferentemente. Em 1939, Dowson, a partir de uma revisão de nomenclatura, reclassificou essa bactéria no gênero *Xanthomonas*. Posteriormente, em 1957, Sûtíc identificou uma bactéria causadora de doença foliar do tomateiro que originalmente foi classificada como *Pseudomonas gardneri*, mas foi somente mais tarde, em 1966, que Dye, ao examinar a bactéria *P. gardneri*, determinou, por meio de testes morfológicos e bioquímicos, que esta bactéria era, na realidade, uma bactéria típica do gênero *Xanthomonas*, nomeando-a *Xanthomonas gardneri* (JONES, 2000; JONES et al., 2004).

Desde então, a doença tem sido observada em áreas de todos os continentes onde o tomateiro é cultivado. De um modo geral, as bactérias do gênero *Xanthomonas* (do grego, “xanthus” = amarelo, “monas” = unidade) são bacilos gram negativos, com um único flagelo polar e aeróbios estritos. A temperatura ótima de crescimento situa-se



entre 25 e 30 °C, formando, em meio de cultura, pequenas colônias amarelas e lisas, butirosas ou viscosas. A disseminação dessa bactéria se dá por meio do solo, sementes, respingos de água e restos de vegetais contaminados, infectando as plantas por meio dos estômatos ou ferimentos causados por equipamentos (BRADBURY, 1993; ALVARENGA, 2004; MEYER e BOGDANOVE, 2009).

Estudos relatam que *Xanthomonas* associada à mancha bacteriana no tomateiro apresenta etiologia bastante complexa, predominando quatro espécies: *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria*. As quatro espécies são encontradas no Brasil, causando prejuízos tanto em tomateiro para processamento industrial como no segmento mesa, na mais importante região produtora do país, a região Centro-Oeste, e em MG, ES, SP, SC, PR, CE (JONES et al., 2004; QUEZADO-DUVAL, 2004; QUEZADO-DUVAL, 2005; ARAUJO et al., 2013; QUEZADO-DUVAL et al., 2013). Em tomateiro, os sintomas da mancha bacteriana aparecem em praticamente todas as partes da planta, e são responsáveis pela redução na produção e na qualidade dos frutos. As manchas nas folhas aparecem com coloração castanha, aspecto encharcado e formato circular (Figura 1), podendo coalescer (GITAITIS et al., 1992; NAIKA et al., 2006).

**Figura 1** - Sintomas iniciais da mancha bacteriana em tomateiro causada por *Xanthomonas gardneri*.



Fonte: Autor

Os prejuízos devido à doença são decorrentes da redução da produção, a queima dos frutos pelo sol e, também, pelo aumento do

custo de produção devido ao uso de produtos químicos. Atualmente, além dos produtos à base de cobre, somente os princípios ativos Acibenzolar-S-Metil (ASM) e cloretos de benzalcônio, possuem registro para o tomateiro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) com indicação para o controle da mancha bacteriana. O ASM é um indutor da resistência sistêmica, e os cloretos de benzalcônio são amônias quaternárias que agem por contato e induzem resistência localizada (GOODE e SASSER, 1980; LOPES e QUEZADO-SOARES, 1997; CIETEC, 2008; AGROFIT, 2011).

Nesse sentido, o uso de produtos químicos de eficiência variada, além de causarem prejuízos no desenvolvimento da planta, causam também sérios danos ao ambiente, contaminando solos e água (SILVA e FAY, 2006; NASCIMENTO et al., 2013). Dessa forma, o desenvolvimento de tecnologias capazes de diminuir ou minimizar a agressão ao ambiente, gerando uma menor produção de resíduos ou poluentes e que sejam, ainda, rentáveis, é necessário.

### **1.3. Indução de resistência e os mecanismos de defesa**

A indução de resistência (IR) envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta a um tratamento com agentes de natureza biótica ou abiótica, incapazes de alterar o genoma da planta. Os elicitores são moléculas capazes de ativar ou induzir respostas de defesa às plantas frente ao ataque de um fitopatógeno, tanto no sítio de contato do indutor com a planta, como em locais distantes do mesmo, sendo de natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos ou ácidos graxos (SMITH, 1996; STANGARLIN et al., 1999; STADNIK e MARASCHIN, 2004; BONALDO et al, 2005).

A ativação das defesas das plantas é realizada por meio da sinalização química, pelo reconhecimento dos fitopatógenos ou elicitores pela planta. Nesse processo, há a interação de compostos com os receptores celulares gerando uma série de alterações nos metabolismos primário e secundário, podendo ocorrer a partir do uso de compostos presentes em extratos de plantas, leveduras, exopolissacarídeos bacterianos, rizobactérias promotoras de crescimento, fungos promotores de crescimento, e ainda representantes não virulentos do patógeno (DI PIERO et al., 2005; KUHN et al., 2006; TOILLIER et al., 2010; STANGARLIN et al., 2010; SALAZAR et al., 2013).

A IR está vinculada à ativação de mecanismos de defesa, desencadeando a formação de barreiras estruturais como lignificação, síntese de calose, indução do fechamento estomatal, além de respostas bioquímicas como a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas antioxidantes, reação de hipersensibilidade, acúmulo de compostos fenólicos, flavonoides, fitoalexinas e diferentes proteínas relacionadas à defesa, como as peroxidases, polifenoloxidasas, entre outras (VAN LOON, 1997; SOARES e MACHADO, 2007; EBRAHIM et al., 2011; GE et al., 2013; SALAZAR et al., 2013).

Os mecanismos estruturais de resistência atuam principalmente como barreira à penetração e/ou à colonização de patógenos, podendo ser constitutivos ou induzidos. Os estômatos, por exemplo, são aberturas naturais cuja função é manter o fluxo contínuo de água entre solo, planta e atmosfera, responsável pelo transporte de nutrientes na planta, além de servir como porta de entrada para o CO<sub>2</sub>, substrato para a fotossíntese. Sendo uma abertura natural, é a principal porta de entrada das fitobactérias e a manutenção do fechamento estomatal está diretamente relacionado à defesa contra o ataque de bactérias e conseqüentemente à redução de doenças (MELOTTO, et al., 2006; GUDESBLAT et al., 2008; GRIMMER et al., 2012). Um dos fatores que induzem o movimento estomático é a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GILL e TUTEJA, 2010).

A rápida geração e acúmulo de EROs, desencadeadas pela explosão oxidativa após a percepção dos elicitores do fitopatógeno, podem atuar de diferentes formas na defesa das plantas. O acúmulo do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apresentam efeitos tóxicos diretos aos patógenos, agindo como antifúngicos e antibacterianos, e também no complexo sistema de sinalização celular, que mediará a ativação da expressão de genes de defesa (ALLAN e FLUHR, 1997; RESENDE et al., 2003; HU et al., 2009; LUKASIK et al., 2012).

As plantas protegem suas células e compartimentos sub-celulares dos efeitos citotóxicos das EROs com o auxílio de enzimas antioxidantes. Em situação de estresse, o papel dos antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) é controlar o acúmulo de EROs e assim limitar o dano oxidativo causado pela produção excessiva das mesmas. Dentre essas enzimas, podem ser destacadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), entre outras (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999;

MITTLER, 2002). Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a glutatona (GSH) e os compostos fenólicos são os principais (DAVAR et al., 2013).

As SODs são metalo-enzimas consideradas a primeira linha de defesa contra as EROs. Essas enzimas dismutam o radical superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FRIDOVICH, 1995), e esse processo é fundamental na defesa contra o estresse oxidativo em organismos aeróbios, incluindo as plantas (GUPTA et al., 1993; SCANDALIOS, 1993). Aumentos na atividade da SOD têm sido observados em plantas expostas a diferentes tipos de estresses ambientais, sendo correlacionados com a tolerância a seca e elementos tóxicos, bem como na redução da severidade de doenças causadas por diversos patógenos (SHARMA e DUBEY, 2005; JETIYANON e PLIANBANGCHANG, 2013).

A CAT possui elevada especificidade pelo  $H_2O_2$ , demonstrando grande eficiência na eliminação dessa ERO em condições de estresses ambientais. A CAT opera sem agente redutor e por isso fornece às plantas uma forma energeticamente eficiente para remoção do  $H_2O_2$  (SHARMA et al., 2012). Segundo Huseynova et al. (2014), o aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e SOD evidencia a ativação de respostas de defesa na planta e essas poderiam ser consideradas marcadores bióticos para investigar a eficiência de elicitores.

A glutatona (GSH) também está envolvida no processo de proteção das células contra os danos causados pelas EROs e é considerada uma molécula marcadora de estresses. No sistema antioxidativo não enzimático, a GSH pode ser encontrado na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), e a razão entre essas formas (GSH/GSSG) é um indicativo do equilíbrio redox celular, diretamente envolvido na percepção e sinalização de EROs (FOYER e NOCTOR, 2005; SHARMA, 2012). A redução de GSSG para GSH é realizada pela glutatona redutase (GR), uma enzima dependente de NADPH, e que o aumento na sua atividade indica que a planta está sob algum estresse e que o aparato da glutatona, em pleno funcionamento, fornecerá maior tolerância ao estresse oxidativo (FOYER et al., 1995; SHARMA e DUBEY, 2007).

Ge et al. (2013) observaram que em cultivares de melão resistentes ao *Colletotrichum lagenarium*, compostos antioxidantes enzimáticos, glutatona redutase e ascorbato peroxidase, e não enzimáticos, glutatona reduzida e ácido ascórbico, são amplamente

expressos durante a defesa do vegetal. Esses compostos, juntamente com as proteínas PR, são essenciais para a defesa de mudas de melão permitindo uma proteção eficiente contra a infecção do patógeno.

Os compostos antioxidantes não enzimáticos, como os compostos fenólicos, apresentam uma grande diversidade química, e diversas funções nos vegetais. Muitos agem como compostos de defesa da planta, atuando diretamente sobre o patógeno, como antifúngicos e antibacterianos, como ácidos clorogênico e caféico, e as fitoalexinas, ou como agentes redutores, como ácido ascórbico e os flavonoides em geral (SCANDALIOS, 1993; AGRIOS, 2004; TAIZ e ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos são sintetizados pela via do ácido chiquímico e regulado pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (FAL).

A FAL é outra enzima amplamente estudada na indução de resistência. Essa enzima é fundamental na biossíntese de fenilpropanóis, atuando na conversão da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, o que resulta em diversos compostos fenólicos, como as fitoalexinas, flavonoides, e principalmente, lignina, que confere resistência à parede celular, e atuam como sinalizadores para respostas de defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos (RAMAMOORTHY et al., 2002; GERASIMOVA et al., 2005; LATHA et al., 2009).

Por outro lado, as proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) respondem pelas maiores mudanças quantitativas nas proteínas solúveis durante as respostas de defesa, sendo subdivididas em diversos grupos, tais como  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), dentre outras, exercendo um importante papel no mecanismo de defesa (BOL e LINTHORST, 1990; DI PIERO e PASCHOLATI, 2004; DE WIT, 2007; SHETTY et al., 2009).

As POXs, por exemplo, além de atuar diretamente em resposta de defesa da célula vegetal, estão envolvidas em diversas reações, podendo participar na retirada de EROs da célula vegetal, juntamente com a CAT, ou na oxidação de substâncias (do grupo dos fenólicos) que são precursoras na síntese da lignina (JEBARA et al., 2005; KANG, 2008). As PFOs, no entanto, ficam separadas espacialmente na célula vegetal, dentro dos tilacóides, e quando ocorre o rompimento da célula, ocorre a liberação dessas enzimas, que ao entrarem em contato com os compostos fenólicos são oxidadas e transformadas em quinonas. As quinonas, por sua vez, são potentes compostos antimicrobianos (VAUGHN e DUKE, 1984).

Mohammadi e Kazemi (2002) relacionaram a indução de resistência contra *Fusarium graminearum* ao incremento da atividade de POX e PFO em plantas de trigo tratadas com micélios autoclavados do próprio patógeno. POX e PFO também foram determinadas como marcadoras bioquímicas para eficácia de biocontroles devido correlação positiva do aumento da atividade das enzimas com a redução da severidade da murcha bacteriana em tomateiro tratado com rizobactérias (SELEIM et al. 2014).

Outro mecanismo bioquímico que é desencadeado nas plantas sob estresse, principalmente com o ataque de patógenos e herbívoros, é a via das lipoxigenases. As LOXs fazem parte das enzimas chave na via biossintética do ácido jasmônico, um fitohormônio relacionado ao estresse vegetal que ativa várias respostas de defesa. Para tanto, as LOXs catalisam a dioxigenação de ácidos graxos poliinsaturados para formação de hidroperóxidos, originando moléculas reativas, e essas, dentro da rota octadecanoide, culminam com a produção do ácido jasmônico (FARMER e RYAN, 1992; SOARES e MACHADO, 2007). Em vegetais, os principais substratos para a lipoxigenase são o ácido linolênico e o ácido linoleico, e os produtos dessa via estão associados com o desenvolvimento vegetal, a defesa contra herbívoros e patógenos, reações de desintoxicação formando glutadiona S-transferase (GST), entre outros (FEUSSNER e WASTERNAK, 2002).

Diversos trabalhos apontam que a ativação das enzimas LOXs, seja por agentes bióticos ou abióticos, atua na defesa do vegetal, reduzindo os danos causados pelos patógenos. A utilização de tratamentos a base de rizobactérias, por exemplo, estimularam a atividade da LOX em plantas de tomateiro e soja. Esse incremento enzimático foi essencial para a resistência das plantas contra *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*, respectivamente (CHOUDHARY, 2011; FERRAZ et al., 2014).

Diante do exposto, percebe-se que a ativação dos mecanismos de defesa latente das plantas proporciona uma rápida e eficiente resposta frente ao ataque de fitopatógenos. No entanto, sabe-se também que todo esse estímulo acaba gerando custos para a planta que no final do processo, nem sempre são vantajosos. Estudos demonstram que o processo de IR acaba demandando síntese de novas proteínas e/ou enzimas específicas para o processo, e isso pode fazer com que a planta deixe de investir em crescimento para investir em defesa (VAN HULTEN et al., 2006). Segundo Logemann et al. (1995) e Suzuki et al. (2006), a IR em plantas de fumo e salsa acarretaram em redução de

crescimento das plantas, e isso ocorreu por conta das células deixaram de expressar proteínas relacionadas à multiplicação celular para investir em proteínas relacionadas à defesa.

Trabalhos realizados com o indutor comercial Acibenzolar-S-Metil (ASM) demonstram grande efetividade para o controle de diversas doenças vegetais. No entanto, alguns resultados indicam que, dependendo da frequência de aplicação, do estágio de desenvolvimento e condições nutricionais da planta e da quantidade de inóculo do patógeno, a ativação dos mecanismos de defesa pode gerar um custo energético para as plantas, resultando em redução de crescimento e de produtividade (CSINOS et al., 2001; PRATS et al., 2002; WALTERS et al., 2013). Dessa forma, a partir da ativação dos mecanismos de defesa da planta, a indução de resistência pode ser considerada uma forma alternativa ao uso de agroquímicos para o controle de fitopatógenos, sendo capaz de auxiliar no controle de doenças em determinadas culturas. No entanto, deve-se procurar por compostos que sejam reconhecidos pela planta e que desencadeiem diferentes respostas de defesa sem prejudicar o desenvolvimento do vegetal.

#### **1.4. Polissacarídeos e MAMP's no controle de doenças de plantas**

Os biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos, são os mais abundantes compostos orgânicos da biosfera, exibindo importantes propriedades e diferentes aplicações, dependendo das suas características químicas. Fungos, bactérias e plantas vêm sendo exaustivamente pesquisados como fontes potenciais para obtenção dessas macromoléculas, principalmente de polissacarídeos (GERN et al., 2008). Muitos desses têm sido pesquisados por apresentar grande potencial em elicitar respostas de defesa em plantas, intensificando os estudos relacionados à sua extração e caracterização.

Os polissacarídeos derivados de microrganismos e de vegetais são capazes de induzir respostas de defesa, mesmo em baixas concentrações, sendo utilizados como modelos em plantas para estudos relacionados à indução de resistência a doenças. Destacam-se, entre eles, os oligossacarídeos de  $\beta$ -glucanas, as quitinas, as quitosanas e os exopolissacarídeos excretados por bactérias (BARBOSA et al., 2004; ADAMS, 2004; WANG et al., 2008).

As plantas, por sua vez, foram preparadas evolutivamente para detectar moléculas microbianas conservadas, chamadas de padrões

moleculares associados a microrganismos ou patógenos (MAMP's/PAMP's), e ativar respostas imunes. Esses compostos são estruturas essenciais aos microrganismos patogênicos, não patogênicos e saprofiticos, e por esse motivo são conservadas. MAMP's/PAMP's são reconhecidas pelos receptores de reconhecimento, que estão localizados na superfície de células de plantas, e por isso facilmente induzem diversas respostas de defesa (AUSUBEL, 2005; JONES e DANGL, 2006; ZHANG e ZHOU, 2010).

Nesse sentido, as cápsulas sintetizadas por procariotos (estrutura localizada externamente às células bacterianas) são facilmente reconhecidas pelos receptores celulares e por isso são capazes de ativar a defesa de plantas contra doenças de importância agrônômica, visto que o EPS capsular é o principal constituinte deste polímero orgânico em bactérias fitopatogênicas. EPS extraídos de espécies de *Xanthomonas*, por exemplo, já demonstraram que têm potencial elicitor capaz de proteger plantas de café contra *Hemileia vastatrix* (GUZZO et al., 1993), plantas de trigo e cevada contra *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana*, e *Drechsleratritici-repentis* (BACH, 1997; BACH et al., 2003; CASTRO e BACH, 2004), e plantas de tomate e couve contra *X. gardneri* e *X. campestris*, respectivamente (LUIZ, 2013). Nesses trabalhos pode-se observar que a aplicação do EPS resultou em incrementos na atividade de enzimas como peroxidases, polifenoloxidasas e FAL.

Além dos EPS bacterianos, outros MAMP's já foram estudados como moléculas indutoras de resistência em plantas. Em *Arabidopsis thaliana* a aplicação de lipooligossacarídeos e peptídeoglucanos de *X. campestris* pv. *campestris* resultou em diversas alterações nas respostas de defesa, em especial, na transdução de sinais de compostos mediados pela rota do ácido salicílico, proporcionando às plantas resistência contra a própria *X. campestris* pv. *campestris* (ERBS et al., 2008; PROIETTI et al., 2014).

Em estudos realizados por Jetiyanon e Plianbangchang (2013), os lipopolissacarídeos (LPS) extraídos da rizobactéria *Enterobacter asburiae* foram capazes de induzir resistência sistêmica em alface (*Lactuca sativa*) contra a podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc). As plantas de alfaces tratadas com LPS apresentaram redução de cerca de 90% na incidência da doença em relação aos controles, e um aumento significativo nas atividades das enzimas superóxido dismutase e peroxidase.



Da mesma forma, Shetty et al. (2009) observaram que a aplicação de  $\beta$ -glucanas extraídas de *Septoria tritici* foi capaz de induzir resistência em trigo contra o próprio patógeno. Os autores atribuíram a redução da severidade da doença ao aumento na atividade da  $\beta$ -1,3 glucanases e quitinases. Já Hael-Conrad et al. (2015) observaram que uma proteína extracelular de *Acremonium strictum* (AsEs) atuou na proteção de plantas de *A. thaliana* desafiadas com *Botrytis cinerea*. Os autores observaram que a AsEs induz resistência nas plantas tanto local como sistemicamente, e que essa proteína desencadeou sinalizações para as vias do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno.

Tendo em vista que EPS, de modo geral, podem ser reconhecidas como MAMP's pelas plantas, os EPS do gênero *Lactobacillus* despertam o interesse pois além de fácil obtenção, podem apresentar potencial em elicitar os mecanismos de defesa nas plantas de tomateiro e a sua utilização na agricultura poderia ser uma alternativa ao uso de agroquímicos no controle de doenças.

### **1.5. *Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* é uma espécie de bactéria do diversificado gênero de *Lactobacillus*, que compreende mais de 90 espécies. Os indivíduos desse gênero são divididos em três grupos funcionais, dependendo das suas capacidades de fermentação, sendo eles os obrigatoriamente homofermentativos (Grupo I) capazes de fermentar exclusivamente hexoses em ácido lático, os facultativos heterofermentativos (Grupo II) que além de fermentarem hexoses em ácido lático são capazes de fermentar pentoses e/ou glutamato, grupo ao qual se encontra o *L. plantarum*, e os obrigatoriamente heterofermentativos (Grupo III) que fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono (KANDLER e WEISS, 1986).

A espécie *L. plantarum* se difere dos demais do gênero por ter o genoma relativamente grande e ampla capacidade de adaptação a condições diversas. Essa bactéria é capaz de fermentar vários carboidratos, predominando nos alimentos de forma espontânea, como em leite e seus derivados, e alimentos em conserva. Por tolerar pH baixo, essa bactéria consegue sobreviver até a passagem das condições ácidas do estômago humano, onde o pH é geralmente inferior a 4,0

(JOHANSON et al., 1993; KLEEREBEZEM et al., 2003; PULIDO et al., 2005; PLENGVIDHYA et al., 2007).

Um dos mais importantes compostos bioativos produzidos por *L. plantarum* são os exopolissacarídeos (EPS). Os EPS, produzidos pelas bactérias ácido lácticas (BAL), são polissacarídeos de cadeia longa que consistem em glucose, galactose, frutose, manose ou outros monossacarídeos. Esses EPS são amplamente utilizados na indústria alimentícia para melhorar a textura, o sabor e a reologia de produtos fermentados (ISMAIL e NAMPOOTHIRI, 2010; GARAI-IBABE et al., 2010). Nos últimos anos, alguns pesquisadores relataram que os EPS oriundos de BAL apresentam potencial antioxidante, anti-tumoral e atividades imunestimulantes em humanos (WELMAN et al., 2003). Os EPS de *L. plantarum*, por exemplo, podem interagir dinamicamente durante longo período de tempo com a mucosa intestinal, melhorando a microflora, desempenhando papel crucial no sistema imune dessa mucosa (GALDEANO et al., 2011; TANG et al., 2015).

Outra atividade observada com a utilização do EPS de *L. plantarum* foi a ação antimicrobiana. Em ensaio de difusão em ágar, Li et al. (2014) mostraram que EPS de *L. plantarum* R315 exibiram atividades antibacterianas contra agentes patogênicos humanos, incluindo bactérias gram negativas (*E. coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Shigella sonnei* e *Salmonella typhimurium*) e gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Bacillus cereus*), a 300 ug mL<sup>-1</sup>. Roselló et al. (2013) encontraram resultados semelhantes de antibiose relacionados a *Lactobacillus*, entretanto, evidenciando atividade antagônica da bactéria em questão contra *Erwinia amylovora* além de bactérias indicadoras (*P. syringae*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*).

Além de naturalmente abundantes, os EPSs de *L. plantarum* podem ser produzidos em larga escala por meio de bioprocessos e, pela baixa toxicidade ao homem e ao ambiente, estima-se que poderiam ser utilizados como indutores de resistência em plantas, visto que tem a possibilidade de ser identificado pela célula vegetal como MAMP's (padrões moleculares associados a microrganismos) (WELMAN e MADDOX, 2003; GERN et al., 2008; ZHANG e ZHOU, 2010; PATEL et al., 2012; SEO et al., 2015). Assim, no presente estudo, optou-se por verificar seu efeito como agente de controle da mancha bacteriana do tomateiro causada por *X. gardneri*. Dessa forma, espera-se contribuir para a redução do uso de agrotóxicos no manejo dessa doença.

## 1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM – Associação brasileira do comércio de sementes e mudas - 2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil.2014. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/releases>. Acesso em: 15 dez. 2015.

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

AGRIANUAL. **AGRIANUAL 2015: Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria,472 p., 2015.

AGRIOS, G N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 922 p., 2004.

AGROFIT. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011, Acessado em 20 de julho. Agrofit on line. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit>

ALLAN, AC; FLUHR, R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. **Plant Cell**, v. 9, p.1559-1572,1997.

ALVARENGA, M A R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**, Lavras: Editora UFLA, 2004.

ARAUJO, E R et al. Specific primers for *Xanthomonas vesicatoria*, a tomato bacterial spot causal agente. **European Journal of Plant Pathology**, v.137, p. 5–9, 2013.

AUSUBEL, FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**, v. 6(10), p. 973–979, 2005.

BACH EE. **Distinção morfológica e isoenzimática de *Bipolaris* spp. e *Drechslera tritici-repentis* do trigo: aspectos bioquímicos nas interações e indução de resistência**. (Doutorado). Escola Superior de

Agricultura de Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1997.

BACH EE, BARROS BC, KIMATI H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xantham gum and heat-inactivate conidia suspension. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.411-418, 2003.

BARBOSA, A M et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BAQUE, MA et al. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1255–1267, 2012.

BEDINI E et al. Structure dependent modulation of a pathogen response in plants by synthetic O-antigen polysaccharides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 2414–2416, 2005.

BOL, J F; LINTHORST, H J. M. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p.113-38, 1990.

BONALDO, S M; PASCHOLATI, S F, ROMEIRO, RS. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, LS; DI PIERO, RM; CIA, P; PASCHOLATI, SF; RESENDE, MLV; ROMEIRO, RS. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 11-28, 2005.

BRADBURY, J F. **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**. Slough: C.A.B. Internation, 332 p., 1993.

CASTRO, O; BACH, E E. Increased production of b-1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystems treated using commercial xantham gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.165-169, 2004.

CIETEC. Inovações e empreendedorismo. 2010. Aprovado primeiro defensivo agrícola nacional para uso no cultivo de cenouras, tomates e batatas. Acessado em 20 de julho. Disponível em: <http://www.cietec.org.br/index.php?id1=30&id2=130>

CHOUDHARY, DK. Plant growth-promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*. **Biotechnology Letters**, v.33, p.2287-2295, 2011.

CSINOS, A S et al. Management of Tomato spotted wilt virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar- S -Methyl and Imidacloprid. **Plant Disease**, v. 85(3), p. 292–296, 2001.

DAVAR, R; DARVISHZADEH, R; MAJD, A. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologia**, v.68, p. 821-829, 2013.

DE WIT, PJ. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Science**, 2007.

DI PIERO, RM; GARCIA Jr, D; TONUCCI, NM. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, LS; DI PIERO, RM; CIA, P; PASCHOLATI, SF; RESENDE, MLV; ROMEIRO, RS (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.29-50.

DI PIERO, RM; PASCHOLATI, SF. Effect of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* mushrooms on the interaction tomato-*Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.58-63, 2004.

ERBS, G et al. Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: structure and activity. **Chemistry and Biology**, v.15(5), p. 438–448, 2008.

EBRAHIM, S; USHA, K; SINGH, B. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. **Science against microbial**

**pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 1043-1054, 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.  
**FAOSTAT**. Disponível em:  
 <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> Acessado em 10 jan. 2014.

FARMER, EE; RYAN, CA. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound – inducible proteinase inhibitor. **Plant Cell**, vol. 4, n. 2, p. 129-134, 1992.

FAYETTE, J et al. The role of cymoxanil and famoxadone in the management of bacterial spot on tomato and pepper and bacterial leaf spot on lettuce. **Crop Protection**, v. 31, p.107-112, 2012.

FERRAZ, HGM et al. Rhizobacteria induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p.274-283, 2014

FEUSSNER, I; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 275-297, 2002.

FRIDOVICH I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review of Biochemistry**, v 64, p. 97–112, 1995.

FOYER CH, NOCTOR G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v. 17, p.1866- 1875, 2005.

FOYER CH, et al. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. **Plant Physiology**, v.109, p. 1047–1057, 1995.

GALDEANO, C M et al. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-

energy-malnutrition model in mice. *Bio Medic Central Gastroenterol*, v. 64, p. 1-14, 2010.

GARAI-IBABE, G et al. Naturally occurring 2-substituted (1,3)- $\beta$ -d-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9254–9263, 2010.

GE, Y; BI, Y, GUEST, D. I. Defence responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 81, p.13-21, 2013.

GERN , RMM et al. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 76-82, 2008.

GERASIMOVA, NG; PRIDVOROVA, SM; OZERETSKOVSKAYA, OL. Role of l-phenylalanine ammonia lyase in the Induced Resistance and Susceptibility of potato plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol. 41, n. 1, p. 103-105, 2005.

GIOVANELLI G; PARADISO A. Stability of dried and intermediate moisture tomato pulp during storage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 7277–7281, 2002.

GILL, SS; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48(12), p. 909–930, 2010.

GRIMMER, MK; FOULKES, MJ; PAVELEY, ND. Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. **Journal of Experimental Botany**, v. 63(2), p. 695–709, 2012.

GITAITIS, R; McCARTER, S; JONES, J. B. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. **Plant Disease**, v. 76, n. 7, p. 651-656, 1992.

GOODE, M J; SASSER, M. Preservation the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, v. 64, p. 831-834, 1980.

GUDESBLAT, GE; TORRES, PS; VOJNOV, AA. *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. **Plant Physiology**, v. 149(2), p. 1017–1027, 2008.

GUPTA A S, et al. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 1629–1633, 1993.

GUZZO, SD et al. Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gums inducers of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, v. 139, p. 119-128, 1993.

HAEL-CONRAD, V et al. The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v.241, p.120–127, 2015.

HU, Z et al. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* ‘Opera 8277’ leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 995-1002, 2009.

HUSEYNOVA, IM; SULTANOVA, NF; ALIYEV, JA.. Histochemical visualization of ROS and antioxidant response to viral infections of vegetable crops grown in Azerbaijan. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 81, p. 26–35, 2014.

ISMAIL, B; NAMPOOTHIRI, K M. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. **Arch Microbiology** v.192, p. 1049–1057, 2010.



JEBARA, S et al. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v.162(8), p. 929–936, 2005.

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, p. 301-307, 2013.

JOHANSON, M L et al. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, p. 15-20, 1993

JONES, J B et al. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1211-1219, 2000.

JONES, J B et al. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 755-762, 2004.

JONES, J D G, DANGL, J L. The plant immune system. **Nature Reviews**, v. 444, p. 323–329, 2006.

KUHN, O J et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina/PR, v. 27, n. 1, p. 13-20, 2006.

KANG, N. J. Inhibition of powdery mildew development and activation of antioxidant enzymes by induction of oxidative stress with foliar application of a mixture of riboflavin and methionine in cucumber. **Scientia Horticulturae**, v.118(3), p. 181–188, 2008.

KANDLER, O., WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods, in

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J. Eds., Williams & Wilkins, Baltimore. v. 2, p. 1208-1234, 1986.

KLEEREBEZEM, M et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A. v. 100, p.1990- 1995, 2003.

KUC, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet, K.(ed). **Innovative approaches to plant disease control**. New York, p.255- 274, 1987.

LATHA, P et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v.50, n.2, p.85-93, 2009.

LEYNS, F et al. The host range of the genus *Xanthomonas*. **Botanical Review**, Lancaster, v. 50, n. 3, p. 318-355, 1984.

LUIZ, C et al. 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.

LUIZ C. **Efeito de polissacarídeos no controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas gardneri*) e da podridão negra da couve-flor (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)**. (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Florianópolis, 2013.

LUKASIK, I; GOLAWSKA, S; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, p. 1937-1941, 2012.

LOGEMANN, E et al. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. **Plant Journal**, v. 8, p. 865-878, 1995.

MELLO, SCM; TAKATSU, A; LOPES, CA. Diagrammatic scale for assessment of tomato bacterial spot. **Brazilian Phytopathology**, v. 22, p. 447-448, 1997.

MELOTTO, M et al. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. **Cell**, v. 126(5), p. 969–980, 2006.

MOHAMMADI, M, KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162(4), p. 491–498, 2002.

MEYER, DF; BOGDANOVA, AJ. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. **Plant Pathogenic Bacteria – Genomics and Molecular Biology**. Ed.: Jackson, R.W. Caister Academic Press. Norfolk, UK. p. 147-161, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.

NASCIMENTO, A R et al. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 15-24, 2013.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L E et al. The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. **Food Chemistry**, v. 112, p. 146–149, 2009.

PATEL, S, MAJUMDER, A, GOYAL, A. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52(1), p. 3–12, 2012.

PAZINATO, B C; GALHARDO, R C. **Processamento artesanal do tomate**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1997. 30p.

PLENGVDHYA, V et al. DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 7697-7702, 2007.

PRATS, E, RUBIALES, D, JORRÍN, J. Acibenzolar- S -methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia helianthi*) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60(3), p. 155–162, 2002.

PROIETTI, S et al. *Xanthomonas campestris* lipooligosaccharides trigger innate immunity and oxidative burst in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 85, p.51–62, 2014.

PULIDO, R P et al. Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture dependant methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 7872-7879, 2005.

QUEZADO-DUVAL, A M et al. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p. 157-161, 2004.

QUEZADO-DUVAL AM, LOPES, CA. Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil. **Acta Horticulturae**, v. 695, p. 101-108, 2005.

QUEZADO-DUVAL, A M et al. **Cuidados especiais no manejo da cultura do tomate no verão**. Comunicado Técnico. n. 43. Embrapa Hortaliça, 2007.

QUEZADO-DUVAL, A M et al. Levantamento de doenças e mosca branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil. **Boletim Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, v. 100, p. 1677-2229, 2013.

RAMAMOORTHY, V; RAGUCHANDER, T; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.429-441, 2002.

RESENDE, MLV, SALGADO, SML; CHAVES, ZM. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

ROBERTS, PD et al. Evaluation of spray programs containing famoxadone plus cymoxanil, acibenzolar-S-methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato. **Crop Protection**, v. 27, p. 1519–1526, 2008.

SALAZAR, SM et al. Avirulent strain of *Colletotrichum* induces a systemic resistance in strawberry. **Europea Journal Plant Pathology**, v.135, p. 877-888, 2013.

SCANDALIOS JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7- 12,1993.

SELEIM, M A et al. Peroxidase and polyphenoloxidase activities as biochemical markers for biocontrol efficacy in the control of tomato bacterial wilt. **Journal of Plant Physiology and Pathology**, v.1, p. 8–11, 2014.

SEO, B et al. Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content antioxidant and free radical scavenging efficacy. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 49(4), p. 282-292, 2015.

SHARMA P, DUBEY RS. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 209–221, 2005.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.

SHETTY, NP et al. Effects of b-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 15, p. 4287–4300, 2009.

SILVA, CMMS; FAY, EF. **Impacto ambiental do fungicida metalaxil**. 96 p. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

SMITH, C J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v. 132, p. 1-45, 1996.

SOARES, AMS; MACHADO, OLT. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 10, 2007.

STADNIK, M J; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, SC: CCA/UFSC, 2004. 293p.

STANGARLIN, JR et al. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.91-98, 2010.

STANGARLIN, JR et al. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, v.2, n.11. p.16-21, 1999.

SUZUKI, K et al. Elicitor-induced down-regulation of cell cycle-related genes in tobacco cells. **Plant, Cell and Environment**, v. 29(2), p. 183–191, 2006.

TANG, Y et al. Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus Plantarum* Induces Maturation of Dendritic Cells in BALB/c Mice. **Plos One**, v. 10(11), p. 1-16, 2015.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4th Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers; 2006.

TOILLIER, S L et al. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.99-110, 2010.

VAN LOON, LC. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.

VAN LOON, LC; VAN STRIEN, EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN HULTEN, M et al. Cost and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 5602–5607, 2006.

VAUGHN KC, DUKE SO. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiol Plantarum**, v. 60, p.106–112, 1984.

WALTERS, D R; RATSEP, J; HAVIS, ND. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64(5), p. 1263–1280, 2013.

WANG, WP; DU, YM; WANG, XY. Physical properties of fungal chitosan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24 (11), p. 2717-2720, 2008.

WELMAN, AD; MADDOX, IS. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 21(6), p. 269–274, 2003.

ZHANG, J; ZHOU, JM. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Molecular Plant**. v. 5, p. 783–793, 2010.





## **CAPÍTULO 2 - Exopolissacarídeos de *Lactobacillus plantarum* alteram as rotas do ácido salicílico e ácido jasmônico em tomateiro e promovem o controle da mancha bacteriana**

**RESUMO** – Bactérias ácido-láticas produzem vários exopolissacarídeos que exibem importantes propriedades e diferentes aplicações. Dentre as diversas características, esses exopolissacarídeos podem ter ação antimicrobiana e/ou induzir respostas de defesa nas plantas. Este trabalho objetiva avaliar o potencial do exopolissacarídeo (EPS) de *L. plantarum* sobre a proteção de plantas de tomateiro contra a mancha bacteriana, verificando o modo de ação do produto. Após a caracterização do EPS por FTIR, plantas de tomateiro com 5 folhas expandidas foram tratadas com EPS a 0; 0,5; 1,5 e 3,0 mg mL<sup>-1</sup>, e a inoculação do patógeno foi realizada 3 ou 7 dias depois. Mecanismos de defesa (teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides, e atividade da FAL, LOX E GR) foram quantificados a partir de plantas de tomateiro tratadas com água destilada, EPS (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ou Acibenzolar-S-metil (ASM; 0,05 mg mL<sup>-1</sup>), inoculadas ou não com *X. gardneri*. *In vitro*, testou-se a atividade antimicrobiana do EPS (1,5 e 10 mg mL<sup>-1</sup>) contra *X. gardneri*. Verificou-se redução de mais de 70% na severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro tratadas com o EPS de *L. plantarum* a 1,5 mg mL<sup>-1</sup> em relação à testemunha. O EPS de *L. plantarum* induziu resistência quando aplicado 3 dias antes da introdução do patógeno, desencadeando alterações no perfil espectrofotométrico, na concentração de ácidos ascórbico e elágico, e na atividade da FAL, da LOX e da GR. *In vitro*, o EPS não apresentou atividade antimicrobiana sobre o agente patogênico. Os resultados do presente estudo mostram a capacidade do EPS de *L. plantarum* em controlar a mancha bacteriana alterando o metabolismo de defesa das plantas de tomate, tanto da via do ácido salicílico (AS) como do ácido jasmônico (AJ).

## 2.1. INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma hortaliça de grande importância na alimentação humana, apresentando elevados teores de sais minerais, vitaminas e açúcares solúveis (RAIOLA et al., 2014). A cultura se destaca na economia como fonte geradora de empregos em sua cadeia produtiva. No entanto, as plantas são altamente afetadas por várias doenças que, dependendo do nível de resistência genética, podem restringir o seu rendimento. A mancha bacteriana causada por espécies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria*) é uma das principais doenças que afetam o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas de tomate (FAO, 2014; QUEZADO-DUVAL et al., 2007; JONES et al., 2008).

A mancha bacteriana se desenvolve principalmente em clima quente e chuvoso e a água livre favorece a propagação do fitopatógeno, bem como a sua infecção e colonização de tecidos vegetais, podendo assim, reduzir até 50% do rendimento da cultura de tomate (QUEZADO-DUVAL et al., 2007). Em condições favoráveis, a progressão da doença é de difícil controle, mesmo quando as estratégias específicas são adotadas, por exemplo, o uso de sementes ou mudas livres de bactérias, a eliminação de hospedeiros alternativos, e também o controle químico (OBRADOVIC et al., 2004; ARAUJO et al., 2013; JONES, 2011). Entre os produtos químicos atualmente utilizados para o controle, os antibióticos agrícolas e compostos à base de cobre têm eficiência variável, prejudicando o desenvolvimento da planta, causando danos ao ambiente e selecionando isolados resistentes ao ingrediente ativo (SILVA e FAY, 2006). Portanto, são necessárias outras estratégias de controle.

Uma alternativa ao método convencional de controle de doenças em plantas pode ser a indução de resistência onde elicitores são aplicados nas plantas para ativar genes que promovem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese e o acúmulo de compostos antimicrobianos no tecido próximo ao local de infecção, tais como os fenólicos (TIAN et al., 2006; GE et al., 2013; EBRAHIM et al., 2011; SALAZAR et al., 2013). Os elicitores também podem alterar a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL), a primeira enzima ativada na via dos fenilpropanóides, responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amoníaco. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos que se encontram presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonoides,

ligninas e ácido salicílico, dentre outros. O ácido salicílico, por exemplo, está diretamente relacionado com a indução de resistência, atuando como antimicrobiano e sinalizador. Os ácidos elágico e ascórbico, por sua vez, atuam como agentes antioxidantes, protegendo as células contra os danos oxidativos (GAO et al., 2015; TIAN et al., 2006; ZHANG e ZHOU, 2010).

Semelhante aos compostos fenólicos, a glutatona (GSH) também está envolvida no processo de proteção das células contra os danos oxidativos. Considerada uma molécula marcadora de estresses, pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A redução de GSSG para GSH é realizada pela glutatona redutase (GR), e o aumento na atividade dessa enzima indica que a planta está sob algum estresse, e que o ‘aparato da glutatona’, em pleno funcionamento, fornecerá maior tolerância ao estresse oxidativo (SHARMA e DUBEY, 2007; SHARMA et al., 2012).

Outro importante sinalizador de estresse nas plantas é o ácido jasmônico (AJ). As lipoxigenases (LOXs) são enzimas-chave para que ocorra a via biossintética do AJ. Essas enzimas catalisam os ácidos graxos poliinsaturados para hidroxiperóxidos, originando moléculas reativas, a exemplo do  $H_2O_2$ , culminando com a produção do AJ dentro da rota dos octadecanóides. Os produtos dessa via atuam no desenvolvimento vegetal, na defesa contra herbívoros e patógenos, nas reações de desintoxicação, formando glutadiona S-transferase (GST), entre outros (FEUSSNER e WASTERACK, 2002).

Na procura por compostos que possam induzir a resistência e ser integrados ao controle alternativo de doenças de plantas, os polissacarídeos, tais como beta-glucanos, quitinas, quitosana presentes nas paredes celulares de fungos e leveduras, bem como exopolissacarídeos (EPS) secretados por bactérias, despertam o interesse por serem compostos naturais com relativa facilidade de obtenção (WANG et al., 2008; BARBOSA et al., 2004; LEEMHUIS et al., 2013). Além disso, as plantas foram preparadas evolutivamente para detectar moléculas microbianas conservadas, chamadas de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP's), e ativar respostas de defesa (ZHANG e ZHOU, 2010).

Em geral, as bactérias ácido-lácticas produzem uma grande variedade de EPS cujas propriedades físico-químicas são únicas (NOTARARIGO et al., 2013). EPS produzidos por espécies do gênero *Lactobacillus*, em especial *L. plantarum*, têm sido relatados como

importantes agentes probióticos, trazendo vários benefícios para a saúde humana, sendo geralmente reconhecidos como seguros (Generally Recognized As Safe - GRAS) pela USFDA (United States Food and Drug Administration) e não tóxicos para o ambiente (LEIS, et al., 2001; SEO et al., 2015). Por apresentarem na sua composição estruturas que possam ser reconhecidas pela planta, acredita-se que também possam desencadear respostas de defesa em vegetais. Somado a isto, bioprocessos conduzidos com microrganismos, em geral, apresentam baixo custo de produção e alto potencial de mercado devido à possibilidade do controle apurado do processo de produção, predizendo uma matéria-prima de maior qualidade, estável, padronizada, com extração facilitada e vantagens ambientais (BAQUE et al., 2012; HUANG e MCDOLNAL, 2009).

Dessa forma, este trabalho objetiva avaliar os EPS extraídos de *L. plantarum* como elicitores dos mecanismos de defesa relacionados às rotas do ácido salicílico e ácido jasmônico no tomateiro, e seu consequente efeito na severidade da mancha bacteriana causada por *X. gardneri*.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Obtenção e caracterização do EPS de *Lactobacillus plantarum*

A bactéria *L. plantarum* (CCT 0580, ATCC 8014) foi adquirida junto à Coleção Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, SP). O meio para fermentação utilizado foi o soro de tofu (fornecido pela empresa Tofutura Indústria de Alimentos Ltda), suplementado com glicose (11,5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (1 g L<sup>-1</sup>), citrato de sódio (3 g L<sup>-1</sup>), Tween 80 (1 mL L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,4 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (0,2 g L<sup>-1</sup>), MnSO<sub>4</sub> (0,05 g L<sup>-1</sup>).

O preparo da bactéria foi efetuado a partir de 2 mL do inóculo inicial armazenado em glicerol estéril 2%, adicionado em 20 mL de caldo nutriente. Posteriormente, o caldo nutriente contendo o inóculo foi repicado para 200 mL de meio de soro de tofu. Cada etapa do escalonamento foi realizada a 30 °C por 18h. Para viabilizar e padronizar a produção de EPS, o cultivo de *L. plantarum* foi realizado em biorreator *airlift* (5 L) com parâmetros controlados. O cultivo no biorreator foi conduzido por 30 h, operado com vazões específicas de ar dentro de uma faixa de 0,2 a 1,3 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Automaticamente, o pH foi mantido entre 5,9 e 6,1 e a temperatura a 30 °C. Para evitar a formação de espuma, foram utilizados 0,2 a 0,4 mL L<sup>-1</sup> do antiespumante polipropilenoglicol. O programa BRF.vi, baseado em LabView® e desenvolvido especificamente para o biorreator *airlift*, foi utilizado para o controle e registro do processo.

Após o cultivo, o meio de cultura foi centrifugado (2000 rpm por 20 min) para separação da biomassa microbiana. Visando a obtenção do EPS, o filtrado livre de células foi submetido a nanofiltração, sendo em seguida, rotaevaporado e liofilizado (CAMELINI et al., 2013). O EPS foi analisado por FTIR em equipamento ABD Bomem Inc. FTLA 2000, utilizando pastilhas KBr e os conteúdos de proteína foram determinados utilizando o método de Bradford com BSA como referência.

### 2.2.2 Obtenção, multiplicação e manutenção do patógeno

A bactéria *X. gardneri*, cedida pela Empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA, SAKATA®, e identificada junto à Embrapa Hortaliças (Brasília, DF) com BOX-PCR, usando o primer 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', foi preservada a 25 °C em

tampão fosfato (8,6 mM  $K_2HPO_4$ ; 7,4 mM  $KH_2PO_4$ ). Repicagens periódicas foram realizadas em meio nutriente ágar (NA, 28 g  $L^{-1}$ , Merck, Darmstadt, Alemanha) e as placas incubadas a 25 °C, durante 48h. A suspensão bacteriana foi obtida pela adição de água destilada ao meio de crescimento com auxílio de alça de Drigalsky, e a concentração ajustada para 0,6 ( $DO_{600nm}$ ) equivalente a  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) (COQUEIRO, 2011; LUIZ, 2012).

### 2.2.3 Avaliação da severidade da doença

Sementes comerciais de tomate da variedade Santa Cruz Kada (Paulista), adquiridas da empresa ISLA Sementes Ltda, foram semeadas em bandejas de polietileno expandido contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>. Aos 15 dias após a semeadura, duas plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 2 L, adicionados de solo adubado, recebendo adubações a cada 15 dias. A adubação por vaso consistiu em 20 mL da solução contendo 4,0 g de uréia e 3,8 mL de Eurofit<sup>®</sup> por litro de água destilada. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação à temperatura média de  $28 \pm 2$  °C.

O EPS foi pulverizado em plantas de tomateiro nas concentrações de 0,5; 1,5 e 3 mg  $mL^{-1}$  quando essas apresentavam cinco folhas verdadeiras, aos 3 dias antes da inoculação com *X. gardneri*. Foram utilizados 10 mL de cada suspensão/planta, os quais foram aspergidos em todas as folhas com auxílio de uma pistola de pintura (LPHV, pressão máxima 58 psi, bico 0,7 mm de diâmetro, marca Grifo, Itália) acoplada a um compressor de ar (marca Schulz, Brasil; pressão de 25lb/pol<sup>2</sup>; potência de 180W; vazão de 105  $mL\ min^{-1}$ ). Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida durante 48 h, a fim de favorecer o estabelecimento da bactéria.

Posteriormente, com a concentração de EPS mais efetiva (1,5 mg  $mL^{-1}$ ), avaliou-se o intervalo de tempo entre o tratamento das plantas e a inoculação, testando-se os intervalos de tempos de 3 e 7 dias. Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação sob condições ambientais distintas: no primeiro experimento, a temperatura média foi de  $28 \pm 2$  °C; no segundo, foi de  $19,8 \pm 1$  °C. A forma de tratar e inocular as plantas foram conduzidas conforme descrito anteriormente.

Todos os experimentos foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um vaso contendo duas plantas. A avaliação da severidade da doença foi realizada a partir de 15 dias após

a inoculação das plantas por escala diagramática para mancha bacteriana descrita por Mello et al.(1997) (Anexo A).

Para esses experimentos, água destilada e o indutor de resistência disponível comercialmente, Acibenzolar-S-metil (ASM), 0,05 mg mL<sup>-1</sup>, serviram como controle negativo e positivo, respectivamente. O ASM foi obtido a partir do produto comercial Bion<sup>®</sup>, fornecido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., São Paulo, SP.

#### 2.2.4 Atividade antimicrobiana

O EPS foi preparado e incorporado ao meio de cultura NA (nutriente ágar) de forma que a concentração final correspondesse a 1,5 mg mL<sup>-1</sup>. A mistura obtida foi vertida em placas de Petri com 8 cm de diâmetro. Após a solidificação do NA, a suspensão bacteriana ajustada para 0,1 (DO<sub>600nm</sub>), foi diluída 1000 vezes e alíquotas (100 µL) foram pipetadas sobre a superfície do meio e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Como controle, foi utilizado NA sem a incorporação de EPS. As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C por 48 h e a avaliação realizada pela contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) (adaptado de LUIZ et al., 2012).

No teste de antibiograma, uma suspensão bacteriana ajustada para 0,3 (DO<sub>600nm</sub>), foi diluída 1000 vezes e alíquotas (50 µL) espalhadas em placas de Petri contendo meio NA. Após breve secagem, foram dispostos os discos de papel filtro (5 mm de diâmetro) embebidos com 10 µL da suspensão contendo o EPS (10 mg mL<sup>-1</sup>). Como controle foram utilizados água destilada e antibiótico oxitetraciclina (10 mg mL<sup>-1</sup>), realizando-se cinco repetições por tratamento, sendo a repetição uma placa contendo quatro discos. As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C por 48 h e a avaliação realizada pela formação de halo de inibição de crescimento bacteriano.

#### 2.2.5 Análises bioquímicas

Plantas de tomateiro, com cinco folhas definitivas, foram pulverizadas com EPS de *L. plantarum* (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ASM (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) ou água destilada (controles), 3 dias antes da inoculação com a suspensão bacteriana de *X. gardneri* (10<sup>8</sup> UFC). Amostras foliares de plantas tratadas, inoculadas ou não, foram coletadas aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos produtos. Foram amostradas a segunda, terceira e

quarta folhas, totalizando cinco repetições para cada tratamento. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos transparentes com fecho zip, colocadas em contato com nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer (-80°C), até o momento do seu processamento.

As amostras foram processadas para a avaliação do perfil espectrofotométrico, a quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides, análise de compostos fenólicos por HPLC, bem como a determinação da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), da glutatona redutase (GR) e da lipoxigenase (LOX).

### **2.2.5.1 Varredura espectrofotométrica de plantas de tomateiro tratadas com EPS de *L. plantarum***

Amostras foliares (~250 mg) foram colocadas em 5 mL de etanol-tolueno (1:1, v/v). O tecido foi homogeneizado em almofariz durante 3 min e o extrato resultante ficou em repouso por 15 min. Os extratos foram diluídos em etanol-tolueno (1:5; v/v) e submetidos à varredura espectrofotométrica, com leitura da absorbância de 250 a 750 nm. Foi realizada uma varredura para cada amostra e os resultados foram expressos pela média das absorbâncias de três repetições (COQUEIRO et al., 2011).

### **2.2.5.2 Teor de compostos fenólicos e flavonoides**

Para a quantificação de compostos fenólicos totais e flavonóides em tomateiro, 200 mg do tecido foliar de cada amostra foram triturados em gral de porcelana com nitrogênio líquido e homogeneizados com 3 mL de metanol 80% acidificado (metanol:HCl = 80:1, v/v). A mistura obtida foi inicialmente incubada no escuro por 1 h em temperatura ambiente, posteriormente centrifugada (3000g por 5 min), e o sobrenadante recuperado.

A quantificação de compostos fenólicos seguiu a metodologia de McCueet et al. (2000), com modificações. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi misturada com 0,5 mL de metanol (95%), sob agitação em vórtex. A essa mistura foram adicionados 1 mL de etanol (95%), 1 mL de água destilada, e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos acrescentou-se 1mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5%), e a amostra ficou incubada no escuro por 1 hora. A absorbância da solução final foi mensurada a 725 nm em espectrofotômetro e a quantificação de



fenólicos foi baseada em uma curva padrão de ácido gálico (0,0-100 µg). Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca ( $\mu\text{gEAG.g.MF}^{-1}$ ).

Para a quantificação de flavonoides acrescentou-se em 0,5 mL do extrato bruto, 2,5 mL de etanol (99%) e 0,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (2%). Após uma hora de repouso no escuro foi mensurada a absorbância a 420 nm e o teor de flavonoides foi expresso em µg de equivalentes de quercetina por g de massa fresca ( $\mu\text{g EQ. g.MF}^{-1}$ ).

### **2.2.5.3 Análise de cromatografia dos compostos fenólicos (HPLC)**

Alíquotas (10 µL) de extrato utilizado na determinação de compostos fenólicos totais foram injetados em um equipamento de cromatografia líquida (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000) equipado com uma coluna de fase inversa ( $C_{18}$  de fase reversa (Phenomenex LC-18, 250mm x 4,6mm, 5µm Ø interno; 40 °C) e um detector espectrofotométrico de UV-visível ( $\lambda = 280$  nm). Para a eluição das amostras foi usado uma solução água acidificada (HCl) pH 3,0: metanol PA (85:15 v/v) como fase móvel e fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . A identificação dos compostos de interesse foi efetuada por comparação dos tempos de retenção de amostras com as de compostos padrão (ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, epicatequina, galocatequina, ácido cafeico e rutina). A quantificação de ácidos fenólicos foi realizada utilizando curvas padrão do composto majoritário (ácido ascórbico). Os resultados foram expressos em µg por massa fresca e referem-se á média de três injeções consecutivas para cada amostra (n = 3).

### **2.2.5.4 Determinação da atividade de fenilalanina amônia liase**

Amostras de tecido foliar (0,1g) foram homogeneizadas em tampão borato de sódio 25 mM (pH 8,8) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 1 mM) e polivinilpirrolidona (PVP 0,5 %) para a determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase. A solução obtida foi centrifugada (20.000 g por 30 min, a 4 °C) e o sobrenadante (extrato protéico) recuperado. A atividade enzimática foi determinada segundo Falcón et al. (2008), com adaptações. Como substrato, foi utilizado fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). Em 250 µL do substrato foram adicionados 250 µL do extrato

protéico e a mistura incubada a 40 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 5 N e banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, 300 µL de água destilada foram adicionados e a absorbância da solução final mensurada a 290 nm. Os resultados foram expressos em nmol de ácido trans-cinâmico formado por mg de proteína por minuto de reação (nmol ácido trans-cinâmico min<sup>-1</sup> mg proteína).

### 2.2.5.5 Atividade de glutathiona redutase e lipoxigenase

Amostras foliares (~100 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Ao macerado foram adicionados 1,5 mL de tampão Tris-HCl (50 mM) juntamente com CaCl<sub>2</sub> (20 mM), pH 8.0. O extrato resultante foi centrifugado a 5.500 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante (extrato proteico) foi recuperado, e a atividade de lipoxigenases (LOX) sobre o ácido linoléico determinada segundo o método descrito por Axelrod et al. (1981), e a atividade da glutathiona redutase (GR) determinada conforme Carlberg e Mannervik (1985).

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi determinada pela adição de 50 µL de extrato a 250 µL de tampão de reação, constituído de tampão Tris-HCl (0,10 M, pH 7,5), cloreto de magnésio (0,3 mM), glutathiona oxidada (GSSG; 1,0 mM), e NADPH (0,20 mM). O decréscimo na absorbância foi medido durante o primeiro minuto da reação a 340 nm a temperatura de 28 °C, e os resultados expressos em Unidades de GR min<sup>-1</sup>mg de proteína<sup>-1</sup>, sendo 1 unidade de GR considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorbância.

Para as análises das atividades de lipoxigenase (LOX) adicionaram-se 5 µL de extrato e 20 µL de linoleato de sódio (10 µM) em 250 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 6,5). A absorbância da reação foi medida de 20 em 20 segundos, a 234 nm, por um período de 2 min a 40 °C. Os resultados foram expressos em Unidades de LOX min<sup>-1</sup>mg de proteína<sup>-1</sup>, sendo 1 unidade de LOX considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorbância.

Para todas as amostras realizou-se a dosagem de proteínas totais conforme o método de Bradford (1976).

### **2.2.6 Análise estatística**

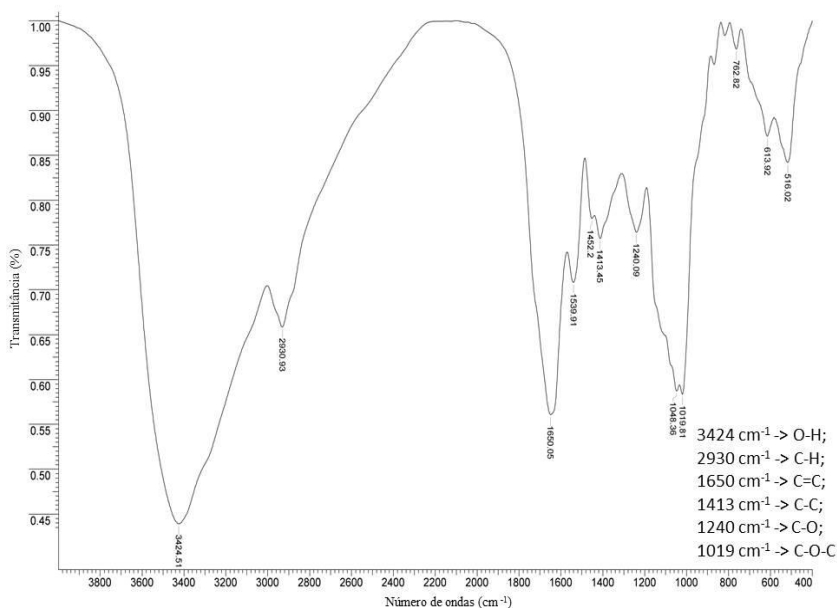
A análise de variância (ANOVA *one way* ou fatorial) e o teste de Tukey foram realizados para verificar a diferença entre as médias das variáveis analisadas nos experimentos. Uma análise de regressão foi requerida para verificar o efeito de doses dos tratamentos (fator quantitativo). As análises foram conduzidas utilizando o software estatístico Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007) e o SISVAR (FERREIRA, 2003).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1 Caracterização do EPS

Os ensaios espectroscópicos na região do infravermelho permitiram a identificação dos grupos funcionais característicos do biopolímero estudado (Figura 2). Observou-se uma banda intensa em  $3.424\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento axial O-H, enquanto aquela na região de  $2.930\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento axial C-H. A banda na região de  $1.650\text{ cm}^{-1}$  refere-se à possível presença de grupos C=C na estrutura do carboidrato. Em adição, as bandas nas regiões de  $1.413$ ,  $1.240$  e  $1.019\text{ cm}^{-1}$  referem-se a um estiramento C-C, à deformação angular C-O, e à deformação axial C-O-C, respectivamente.

**Figura 2** - Espectro de infravermelho do EPS de *Lactobacillus plantarum*, na região de  $4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas com KBr.

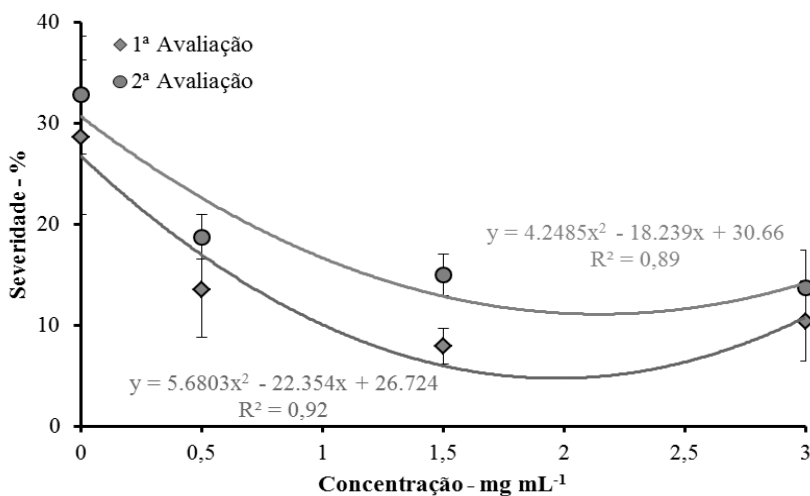


### 2.3.2 Efeito do EPS sobre a severidade da mancha bacteriana

Observou-se um efeito de doses do EPS sobre a severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro inoculadas com *X. gardneri* ( $DO_{600nm}=0,6$ ) 3 dias após a aplicação dos tratamentos (Figura 3).

Aos 9 dias após a inoculação, observou-se uma redução na severidade da doença de 41%, 72% e 62% quando o EPS foi aplicado foliarmente nas concentrações de 0,5; 1,5 e 3,0  $mg mL^{-1}$ , respectivamente. Dezoito dias após a inoculação do fitopatógeno, os níveis de proteção alcançados foram de 30%, 61% e 57%. O ASM, um indutor de resistência comercial e registrado para o tomateiro, foi utilizado como controle positivo, e diminuiu os sintomas da mancha em aproximadamente 93,0 % nas duas datas de avaliação.

**Figura 3** - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro tratadas com EPS de *Lactobacillus plantarum* (0; 0,5; 1,5 e 3,0  $mg mL^{-1}$ ) 3 dias antes da inoculação do patógeno ( $DO_{600nm}= 0,6$ ). A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 9 e 18 dias após a inoculação (1ª e 2ª avaliação). Observou-se efeito significativo de doses de acordo com o teste F ( $p < 0,05$ ).



### 2.3.3 Determinação do intervalo de tempo

Após a verificação da melhor concentração do EPS para o controle da bacteriose em tomateiro, efetuou-se um ensaio para a determinação do melhor intervalo de tempo entre a aplicação dos tratamentos e a inoculação com a *X. gardneri* (3 ou 7 dias de intervalo) (Tabela 1). Em ambos os experimentos, observou-se interação entre as variáveis. O EPS de *L. plantarum* ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) controlou a doença quando aplicado 3 dias antes da inoculação do patógeno, porém essa eficiência foi drasticamente reduzida no intervalo de 7 dias. Por outro lado, observou-se que o indutor comercial (ASM) proporcionou controle da doença independente do intervalo de tempo entre a aplicação do produtor e a inoculação do patógeno, em ambos os experimentos.

**Tabela 1** - Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro submetidas a diferentes intervalos de tempo (3 e 7 dias) entre aplicação de EPS de *Lactobacillus plantarum* ou ASM (Acibenzolar-S-Metil) e a inoculação com *Xanthomonas gardneri* ( $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,6$ ). Avaliações realizadas 15 dias após inoculação.

	Severidade ( %)			
	Experimento 1		Experimento 2	
	3 dias	7 dias	3 dias	7 dias
<b>Água</b>	40,23±2,91Aa	40,62±6,63Aa	21,58±2,01Aa	20,00±1,26Aa
<b>EPS Lac</b>	19,76±5,19Bb	35,69±6,31Aa	13,67±2,16Bb	18,75±3,06Aa
<b>ASM</b>	7,14±4,06Ca	6,71±4,23Ba	0,85±0,53Ca	0,71±0,33Ba

Letras maiúsculas idênticas na coluna e letras minúsculas idênticas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

### 2.3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana do EPS

O EPS em estudo não restringiu o crescimento *in vitro* do agente causal da mancha bacteriana do tomateiro (Tabela 2). Para os experimentos onde o EPS foi incorporado ao meio de cultura (NA), observou-se que não houve diferença significativa no número de colônias de *X. gardneri* em relação à testemunha. Utilizando o teste de disco-difusão em ágar (antibiograma), observou-se que o EPS também

não inibiu o crescimento de *X. gardneri*. O halo de inibição (1 cm) apenas apareceu no bactericida (oxitetraciclina) usado como controle.

**Tabela 2** - Efeito do EPS de *Lactobacillus plantarum* incorporado ao meio de cultura ou adicionado em discos de antibiograma sobre o crescimento de *Xanthomonas gardneri*. Avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano após 48 h de incubação.

	Número de UFC		Halo de Inibição (cm)	
	Exper. 1	Exper. 2	Exper. 1	Exper. 2
Água	120,5 ± 3,9 <sup>ns</sup>	159,3 ± 2,1 <sup>ns</sup>	0	0
EPS Lac	124,5 ± 3,2	154,9 ± 3,5	0	0
Oxitetraciclina*	-	-	1,0	1,0

<sup>ns</sup> Não apresenta diferença significativa pelo teste F (p<0,05).

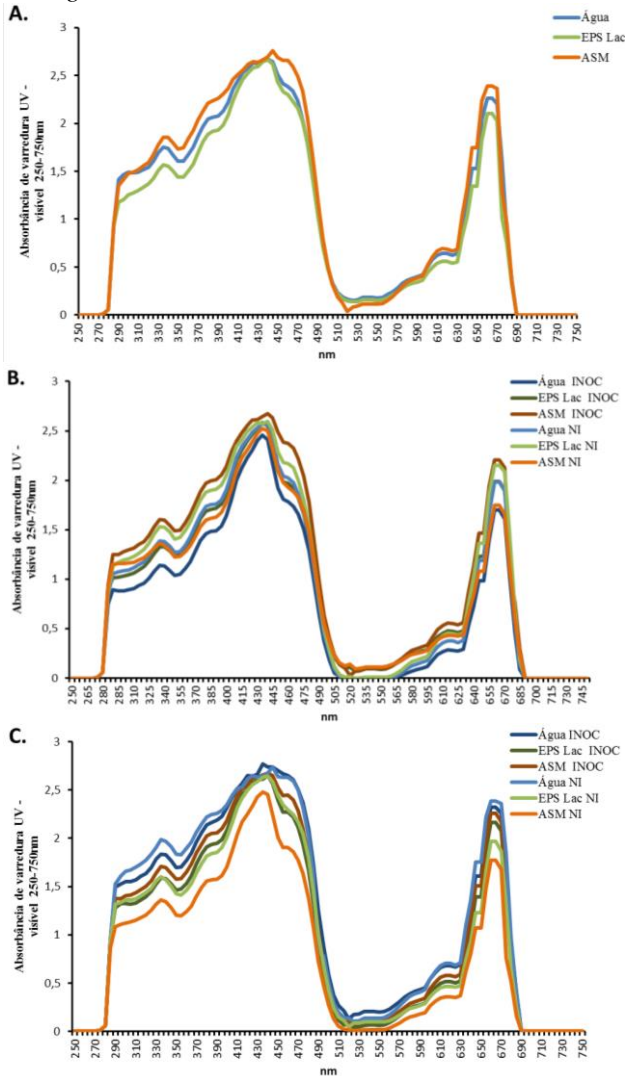
\*Antibiótico utilizado como controle positivo.

### 2.3.5 Perfil espectrofotométrico

Foram constatadas alterações nos perfis espectrofotométricos em plantas tratadas em diferentes intervalos de tempo (Figura 4). Aos 3 e aos 7 dias após os tratamentos, houve diminuição significativa na absorvância na faixa de 285-325 nm em plantas tratadas com EPS de *L. plantarum* em relação à testemunha. Plantas pulverizadas com ASM e inoculadas apresentaram ligeiro aumento na absorvância desta faixa. Entretanto, aos 7 dias após a aplicação do tratamento, plantas tratadas com o indutor comercial apresentaram redução significativa na absorvância, semelhante às tratadas com EPS (Tabela 3).

Na faixa espectrofotométrica de 640-680 nm, plantas tratadas com EPS apresentaram redução na absorvância aos 3 dias após a aplicação do tratamento. Aos 5 dias após a aplicação dos tratamentos, plantas pulverizadas com ASM e EPS, ambas inoculadas, apresentaram aumento na absorvância dos compostos. Todavia, aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos, observou-se redução significativa nessa faixa em plantas tratadas, independente da inoculação (Tabela 3).

**Figura 4** - Perfil espectrofotométrico do extrato etanol-tolueno de plantas de tomateiro aos 3 (A), 5 (B) e 7 dias (C) após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.





**Tabela 3** - Valores médios de absorvância na faixa entre 285-325 nm e 640-680 nm em plantas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após o tratamento (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.

Absorbância 285-325 nm						
	3 dat (antes inoc)		5 dat (2 DAI)		7 dat (4 DAI)	
	-	NI	INOC	NI	INOC	
Água	1,44±0,08A	1,09±0,01Aa	0,90±0,06Bb	1,60±0,05Aa	1,51±0,02Ab	
EPS Lac	1,25±0,02B	1,19±0,05Aa	1,05±0,02Bb	1,33±0,05Ba	1,30±0,14Ba	
ASM	1,44±0,06A	1,15±0,04Ab	1,27±0,04Aa	1,12±0,02Cb	1,39±0,02Ba	

Absorbância 640-680 nm						
	3 dat (antes inoc)		5 dat (2 DAI)		7 dat (4 DAI)	
	-	NI	INOC	NI	INOC	
Água	1,63±0,09A	1,32±0,02Aa	1,11±0,06Bb	1,78±0,04Aa	1,68±0,01Ab	
EPS Lac	1,43±0,10B	1,48±0,05Aa	1,36±0,05Aa	1,35±0,05Bb	1,50±0,05Ba	
ASM	1,72±0,14A	1,12±0,04Bb	1,50±0,09Aa	1,14±0,04Cb	1,59±0,02Ba	

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

### 2.3.6 Teor de compostos fenólicos e flavonoides

Plantas tratadas com EPS de *L. plantarum*, água destilada ou ASM não apresentaram variações significativas no teor de compostos fenólicos com o passar do tempo. Mesmo após a inoculação do patógeno, as variáveis avaliadas mantiveram-se inalterados (Tabela 4).

Em relação aos flavonoides, observou-se aumento significativo nos teores desses compostos após a inoculação do agente causal da

mancha bacteriana, independente dos tratamentos. Entre as plantas tratadas, as previamente pulverizadas com ASM foram as que apresentaram alterações menos expressivas (Tabela 4).

**Tabela 4** - Teor de compostos fenólicos e de flavonoides em plantas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.

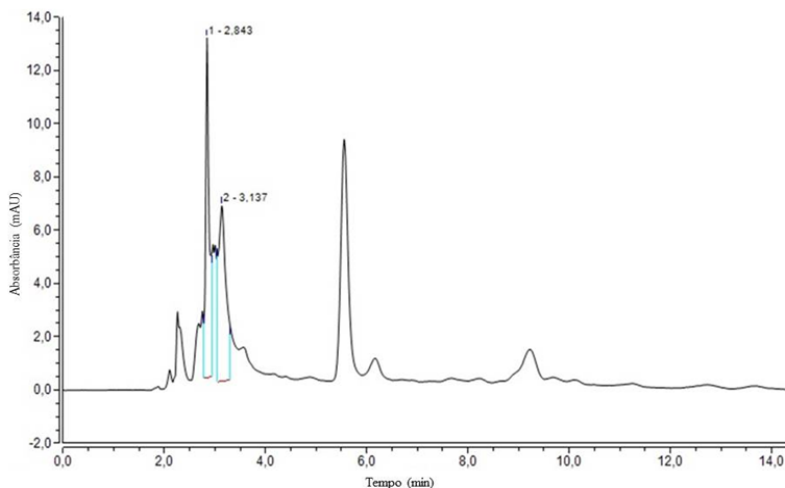
	Compostos fenólicos (ug. MF <sup>-1</sup> )				
	3 dat (antes inoc)	5 dat (2 DAI)	7 dat (4 DAI)		
	-	NI	INOC	NI	INOC
<b>Água</b>	245,57±58,94 <sup>ns</sup>	229,44±52,24 <sup>ns</sup>	134,36±30,62 <sup>ns</sup>	216,61±99,98 <sup>ns</sup>	301,12±43,86 <sup>ns</sup>
<b>EPS Lac</b>	275,94±62,75	185,58±43,74	205,14±49,02	238,15±58,44	328,94±47,34
<b>ASM</b>	314,92±81,54	272,34±65,87	168,32±56,73	321,45±97,73	316,742±76,01
	Flavonoides (ug. MF <sup>-1</sup> )				
	3 dat (antes inoc)	5 dat (2 DAI)	7 dat (4 DAI)		
	-	NI	INOC	NI	INOC
<b>Água</b>	500,16±74,35 <sup>ns</sup>	293,65±36,35 <sup>ns</sup>	285,96±56,54 <sup>ns</sup>	386,58±66,52Ab	1177,07±115,66Aa
<b>EPS Lac</b>	412,00±40,24	412,28±83,64	328,51±89,36	536,11±96,55Ab	1143,18±54,44Aa
<b>ASM</b>	384,83±42,34	407,75±59,06	351,45±82,44	468,65±98,28Ab	703,50±37,23Ba

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. <sup>ns</sup> Não apresenta diferença significativa pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

### 2.3.7 Análise de cromatografia de compostos fenólicos (HPLC)

Observou-se um perfil cromatográfico semelhante em todas as amostras avaliadas (Figura 5). Dois compostos foram identificados e quantificados (ácido ascórbico e ácido elágico), e observaram-se diferenças significativas na concentração desses entre os tratamentos e ao longo do tempo (Tabela 5).

**Figura 5** - Cromatograma representativo de compostos fenólicos em folhas de tomateiro obtido por HPLC (coluna de fase inversa e detector espectrofotométrico de UV-visível;  $\lambda = 280$  nm) com fase móvel H<sub>2</sub>O pH3: MeOH PA (85:15, v/v). (1) ácido ascórbico e (2) ácido elágico.



Aos 5 dias após a aplicação dos produtos observou-se que entre as plantas não inoculadas, as tratadas com ASM apresentaram as maiores concentrações de ácido ascórbico, cerca de 30 % superior em relação à testemunha; por outro lado, nesse mesmo tempo, plantas previamente pulverizadas com EPS e ASM, ambas desafiadas com o fitopatógeno, apresentaram redução de cerca de 30 e 34%, respectivamente, na concentração da ácido ascórbico comparado à testemunha inoculada.

A concentração de ácido ascórbico também se mostrou alterada aos 7 dias após a aplicação dos produtos. Em plantas tratadas com EPS ou ASM, ambas não inoculadas, observou-se uma redução da concentração do composto fenólico em questão, em torno de 50 e 48%, respectivamente, comparado à respectiva testemunha; após a inoculação de *X. gardneri*, plantas previamente tratadas com EPS e ASM apresentaram um acréscimo de 16 e 35%, respectivamente, na concentração de ácido ascórbico em relação à testemunha inoculada (Tabela 5).

A concentração de ácido elágico também apresentou-se alterada aos 5 dias após a aplicação dos produtos. Em plantas não inoculadas, as pulverizadas com EPS apresentaram redução na concentração do ácido elágico em torno de 28% comparado a testemunha; já as plantas tratadas com ASM apresentaram acréscimo de 54% em relação a respectiva testemunha. Após a inoculação do agente causal da mancha bacteriana, as plantas tratadas com EPS e ASM apresentaram acréscimos de 19 e 15%, respectivamente, na concentração do ácido elágico comparado à respectiva testemunha. Aos 7 dias após a aplicação dos produtos, a concentração do ácido elágico teve comportamento semelhante ao ácido ascórbico. Neste caso, plantas tratadas com EPS e ASM, não inoculadas, apresentaram redução de 21 e 30%, respectivamente, na concentração do fenólico em questão e após a inoculação do patógeno, apenas as plantas previamente tratadas com ASM apresentaram aumento na concentração do ácido, cerca de 27% superior à respectiva testemunha (Tabela 5).

**Tabela 5** - Concentração de ácido ascórbico e ácido elágico determinado por HPLC em folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.

	$\mu\text{g}$ ácido ascórbico $\text{MF}^{-1}$			
	5 dat (2 DAI)		7 dat (4 DAI)	
	NI	INOC	NI	INOC
Água	77,82±4,25Bb	223,22±6,09Aa	195,08±1,36Aa	74,24±8,06Bb
EPS Lac	77,34±4,95Bb	153,64±23,43Ba	91,47±1,07Ba	86,84±3,28Aa
ASM	101,36±16,67Ab	146,55±3,88Ba	101,24±8,05Ba	100,71±10,35Aa

	$\mu\text{g}$ ácido elágico $\text{MF}^{-1}$			
	5 dat (2 DAI)		7 dat (4 DAI)	
	NI	INOC	NI	INOC
Água	75,59±4,66Bb	141,38±2,19Ba	97,26±13,40Aa	66,72±2,63Bb
EPS Lac	53,73±1,74Cb	168,45±9,68Aa	76,13±4,14Ba	64,52±2,97Bb
ASM	116,55±9,25Ab	163,08±9,58Aa	67,82±8,45Bb	85,23±2,35Aa

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

### 2.3.8 Atividade de fenilalanina amônia liase

Não foram observadas alterações significativas na atividade da FAL aos três dias após a aplicação dos indutores. Aos cinco dias após a aplicação dos produtos observou-se redução da atividade da FAL em plantas tratadas com EPS ou ASM; por outro lado, nesse mesmo tempo, plantas previamente pulverizadas com ASM e desafiadas com o fitopatógeno apresentaram aumento significativo na atividade enzimática. Finalmente, a atividade FAL foi aumentada aos sete dias após a aplicação do EPS em plantas desafiados com *X. gardneri* (Tabela 6).

**Tabela 6** - Atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) em folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.

	nmol ácido trans-cinâmico min <sup>-1</sup> mg proteína				
	3 dat		5 dat		7 dat
	(antes inoc)		(2DAI)		(4DAI)
	-	NI	INOC	NI	INOC
Água	8,45±2,76 A	10,01±1,8Aa	4,52±2,29 Bb	8,01±3,78 Aa	5,69±2,71 Ba
EPS Lac	8,01±3,45 A	5,37±1,53 Ba	5,30±2,20 Ba	6,44±2,75 Ab	14,69±1,37 Aa
ASM	4,93±2,57 A	3,24±1,73 Bb	11,38±3,14 Aa	5,83±0,37 Aa	8,42±2,47 Ba

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

### 2.3.9 Atividade de glutatona redutase e lipoxigenase

Para atividade da glutatona redutase (GR) não foi possível observar alteração significativa aos três dias após a aplicação dos produtos, ou seja, antes da inoculação (Tabela 7). Após dois dias da inoculação, plantas tratadas com ASM e desafiadas com o agente causal da mancha bacteriana apresentaram um acréscimo na atividade da enzima comparado aos demais tratamentos. Passado quatro dias do desafio bacteriano, plantas tratadas com EPS seguidas de inoculação do patógeno apresentaram maior atividade enzimática comparado aos demais tratamentos.

**Tabela 7** - Atividade da glutatona redutase (GR) em folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.

	GR (U mg proteína <sup>-1</sup> )				
	3 dat		5 dat		7 dat
	(antes inoc)		(2DAI)		(4DAI)
	-	NI	INOC	NI	INOC
<b>Água</b>	24,65±2,51A	19,34±1,65Aa	20,09±5,56Ba	17,72±1,11Aa	17,35±2,13Ba
<b>EPSLac</b>	25,08±3,40A	19,95±4,33Aa	21,54±2,76Ba	18,24±2,20Ab	22,89±1,54Aa
<b>ASM</b>	23,97±4,01A	22,25±3,36Ab	38,47±5,54Aa	16,02±0,90Aa	17,72±3,17Ba

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação) , respectivamente. Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Em relação a lipoxigenase (LOX), observou-se alteração significativa aos três dias após a aplicação do produto, ou seja, antes da inoculação. Neste período, as plantas tratadas com EPS ou ASM apresentaram redução na atividade da enzima comparado às plantas controle (Tabela 8). Aos dois dias após a inoculação, plantas inoculadas com o patógeno apresentaram aumento significativo da atividade enzimática. Aos sete dias após a aplicação dos produtos, observou-se que entre as plantas inoculadas, as plantas previamente pulverizadas com EPS apresentaram maior atividade enzimática.

**Tabela 8** - Atividade de lipoxigenase (LOX) em folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (EPS Lac), Acibenzolar-S-Metil (ASM) ou água, inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.

	LOX (U mg proteína <sup>-1</sup> )				
	3 dat	5 dat		7 dat	
	(antes inoc)	(2DAI)		(4DAI)	
	-	NI	INOC	NI	INOC
<b>Água</b>	9,49±0,34A	6,01±0,67Ab	11,28±0,57Aa	6,18±0,58Aa	4,48±0,38Bb
<b>EPSLac</b>	7,61±0,73B	5,05±0,51Ab	11,82±0,66Aa	4,32±0,29Bb	5,87±0,77Aa
<b>ASM</b>	8,00±0,74B	4,34±0,63Ab	8,45±0,40Ba	4,90±0,30ABa	3,93±0,75Ba

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.



## 2.4. DISCUSSÃO

O espectro de absorção no infravermelho de um composto é provavelmente a sua propriedade física mais original, por isso o espectro é chamado de impressão digital de uma molécula (KACURÁKOVÁ e WILSON, 2001). Polissacarídeos em geral contêm um número significativo de grupos hidroxilas, que apresentam uma ampla banda de absorção arredondada acima do comprimento de onda  $3.000\text{ cm}^{-1}$ .

Estudos demonstram similaridade dos EPSs de espécies de *Lactobacillus*. Os espectros de infravermelho em geral revelam características funcionais, tais como um grupo OH com banda larga entre  $3.700$  e  $3.000\text{ cm}^{-1}$  e grupo metila próximos de  $2.924\text{ cm}^{-1}$ . Os polissacarídeos também apresentam alta absorção na região  $1.200$ - $1.000\text{ cm}^{-1}$  (correspondente à presença de carboidratos). A posição e a intensidade das bandas são específicas para cada polissacarídeo, permitindo assim a sua possível identificação (WANG et al., 2008; AI et al., 2008; NOTARARIGO et al., 2013). Portanto, a posição e intensidade das bandas do polissacarídeo estudado, na faixa em  $3.424$ ,  $2.930$ ,  $1.048$  e  $.1019\text{ cm}^{-1}$ , permitiu a identificação de um polissacarídeo rico em hidratos de carbono com grupos OH e  $\text{CH}_3$ .

Nesse estudo, foi observado que o EPS previamente identificado pela técnica de infravermelho, proporcionou maior controle na severidade da mancha bacteriana do tomateiro quando aplicado nas concentrações  $1,5$  e  $3,0\text{ mg mL}^{-1}$ , porém, não se observou diferença significativa entre as doses no final do experimento. Em relação ao intervalo de tempo entre a aplicação do produto e a inoculação do patógeno, o EPS foi eficaz apenas quando aplicado 3 dias antes da inoculação com *X. gardneri*, indicando provavelmente um efeito direto do polissacarídeo sobre o agente patogênico. No entanto, no presente estudo, os testes não detectaram efeito antimicrobiano do EPS, apesar do seu potencial bactericida já ter sido demonstrado em outros estudos, até mesmo contra bactérias humanas (LI et al., 2014; ROSELLÓ et al., 2013). Desse modo, sugere-se que o EPS poderia ter agido contra o patógeno ativando mecanismos de resistência da planta. Por outro lado, a proteção de plantas de tomate tratadas com o EPS manteve-se durante um curto período de tempo. Ou seja, a aplicação do EPS 7 dias antes da inoculação não foi capaz reduzir a severidade da mancha bacteriana.

O controle da mancha bacteriana proporcionado pela aplicação do EPS em plantas de tomate pode estar relacionado com a capacidade da

planta em reconhecer moléculas de microorganismos ou patógenos (MAMP's/PAMP's). Esse reconhecimento se dá por meio de receptores localizados na superfície da membrana da célula ou no interior da célula, e que desencadeia uma cascata de sinais, culminando para a ativação de mecanismos de defesa. Esse tipo de sistema de defesa permite que as plantas respondam rápido e eficientemente contra vários patógenos (ZHANG e ZHOU, 2010, SHANG et al., 2007).

Os efeitos indutores de EPS bacterianos foram documentados em outros patossistemas. Em plantas de cevada, Antoniazzi et al. (2008) observaram uma redução de 75% na severidade da doença causada por *Bipolaris sorokiniana*. Esse valor foi muito semelhante ao observado com a aplicação de fungicida. O controle da doença, nesse caso, foi atribuído ao aumento da atividade de 1,3-glucanase e dos teores de compostos fenólicos em plantas tratadas com EPS.

Em plantas de café, a aplicação de EPS extraído de *Xanthomonas spp.* (goma xantana) e goma xantana comercial induziu resistência nas plantas contra *Hemileia vastatrix*, reduzindo a severidade da doença em até 92% (GUZZO et al., 1996). Esses efeitos também foram observados em estudos relacionados ao potencial de goma xantana em tomateiro contra *X. gardneri* (LUIZ et al., 2015), e em estudos com EPS extraído de *X. campestris* na indução de resistência em plantas de trigo e cevada contra *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana*, e *Drechslera tritici-repentis* (BACH, 1997; BACH et al., 2003). No presente estudo, a ativação de mecanismos de defesa foi evidenciada pelas alterações nas absorvâncias do extrato da folha, na concentração de fenólicos como o ácido ascórbico e elágico, e também na atividade das enzimas FAL e GR, em plantas tratadas com EPS e ASM.

De maneira geral, as alterações observadas na faixa de 285-325 nm, relacionada à classe de alguns compostos fenólicos, indicam uma mudança nos mecanismos de defesa nas plantas que receberam os produtos, em especial após a introdução do patógeno. A não observação de alterações no teor de compostos fenólicos totais utilizando o método de Folin-Ciocalteu, provavelmente esteja relacionado com o método utilizado, visto que, com a utilização de técnica mais sensível (HPLC), constatou-se diferenças na concentração de fenólicos como ácidos ascórbico e elágico. Os compostos fenólicos apresentam grande importância na defesa do vegetal, uma vez que depois da elicitação, vários compostos fenólicos são oxidados e transformados em compostos antimicrobianos, tais como quinonas (VAUGHN e DUKE, 1984). Já a presença de outros, como ácidos ascórbico e elágico, garantem uma

redução nos danos oxidativos dentro da célula, pois atuam como agentes antioxidantes não enzimáticos. No entanto, a biossíntese e a regulação desses compostos estão diretamente envolvidos com a atividade da fenilalanina amônia liase (FAL).

O aumento da atividade da FAL é frequentemente associado ao aumento da concentração de fenilpropanóides, o que levaria relacionar ao acúmulo de compostos fenólicos, pois a fenilalanina e os fenóis são produzidos pela via do shiquimato. Essa enzima atua na conversão da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, o que resulta em diversos compostos fenólicos, como as fitoalexinas, flavonoides, e principalmente, lignina, que confere resistência à parede celular e atuam como sinalizadores para respostas de defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos (GERASIMOVA et al., 2005; LATHA et al., 2009; RAMAMOORTHY et al., 2002).

No presente estudo, EPS e ASM induziram um aumento na atividade da FAL em plantas inoculadas, no entanto, as plantas tratadas com EPS apresentaram essa alteração mais tardiamente. Comportamento semelhante foi observado para a atividade da glutathione redutase (GR), onde as plantas que receberam o indutor comercial apresentaram elevações na atividade enzimática mais rapidamente. Isto sugere uma diferença na extensão do controle da doença fornecida pelos produtos; ASM, a qual ativou a FAL e a GR mais precocemente, controlou a doença em 90%.

A GR também faz parte do sistema antioxidativo. De maneira geral, nos vegetais, todo o aparato que envolve a molécula glutathione, está envolvido em maior tolerância ao estresse oxidativo (SHARMA, 2012; SHARMA e DUBEY, 2007). Ge et al. (2013), por exemplo, observaram que em cultivares de melão resistentes ao *Colletotrichum lagenarium*, compostos antioxidantes enzimáticos, glutathione redutase e ascorbato peroxidase, e não enzimáticos, glutathione reduzida e ácido ascórbico, são amplamente expressos durante a defesa do vegetal. Esses compostos, juntamente com as PR proteínas, são essenciais para a defesa de mudas de melão permitindo uma proteção eficiente contra a infecção do patógeno.

A aplicação do EPS em plantas de tomateiro ainda desencadeou aumento na atividade da lipoxigenase (LOX), diferentemente do indutor comercial. A LOX faz parte de outra rota metabólica, a via do ácido jasmônico (AJ). O AJ é um fitorhômionio diretamente envolvido com as respostas de defesa da planta frente ao estresse, e por isso é chamado de

sinalizador de estresse. Choudhary (2011) e Ferraz et al. (2014) observaram que a aplicação de indutores bióticos que estimulam a atividade de LOX, contribuem para a resistência de plantas de tomate contra *Fusarium* sp e plantas de soja contra *Macrophomina phaseolina*. O controle das doenças foi atribuído à possível ativação da rota do AJ. Neste sentido, o controle da mancha bacteriana do tomateiro, proporcionada pela aplicação do EPS, foi resultado da ativação de mais de uma rota metabólica, ao contrário do ASM, que por ser uma molécula análoga ao ácido salicílico, ativa prioritariamente os metabólitos oriundos da via dos fenilpropanóides (OOSTENDORP et al., 2001).

Outra evidência de que os produtos do presente trabalho atuaram como elicitores decorreu da alteração da absorbância na faixa entre 640-680 nm (correspondente ao espectro de clorofilas), tanto em plantas tratadas com EPS, como nas tratadas com ASM. As moléculas de clorofila *a* e *b* constituem os dois sistemas de pigmentos responsáveis pela absorção e transferência de energia radiante (FERRI, 2004). Na resistência induzida, os parâmetros de fotossíntese e os fotoassimilados são alterados, principalmente na presença do patógeno, pois os elicitores são capazes de condicionar o metabolismo vegetal e, quando a planta necessitar, os fotoassimilados são carregados para a defesa induzível a fim de disponibilizar energia e desencadear outras respostas de defesa (BOSTOCK, 2005; GAYLER et al., 2004).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o EPS de *L. plantarum* é capaz de induzir resistência em plantas de tomateiro por pré-condicioná-las contra o patógeno, visto que, em plantas previamente tratadas com o biopolímero, observou-se aumento nos compostos e enzimas de defesa somente após o desafio bacteriano. O efeito *priming* é um importante componente da resistência induzida e está associado à rápida e efetiva ativação das respostas de defesa celular, as quais são ativadas somente após o contato com o patógeno, representando custo energético apenas na presença do mesmo (COOLS e ISHII, 2002; CONRATH et al., 2002). Por outro lado, a aplicação de ASM desencadeou aumento dos ácidos fenólicos em plantas de tomate antes mesmo da chegada do patógeno. Essa situação sugere que o indutor comercial poderia estar ativando os mecanismos de defesa da planta desnecessariamente, e somado à excepcional ativação de defesas na presença do patógeno, poderia acabar gerando custos para a planta, que no final do processo, nem sempre são vantajosos. Alguns estudos indicam que o ASM, dependendo da dose, quantidade de aplicações, estágio de desenvolvimento da planta e pressão do patógeno, pode

provocar redução na produção e atraso na maturidade dos frutos, indicando que as células investiram em proteínas de defesa ao invés de proteínas para a multiplicação celular (SUZUKU et al., 2006; WALTERS et al., 2013).

Pode-se concluir que o EPS de *L. plantarum* reduziu a severidade da mancha bacteriana do tomateiro por pré-condicionar as plantas e aumentar os compostos e enzimas de defesa de rotas distintas, como compostos fenólicos, FAL, GR e LOX, após a introdução do patógeno. Além do mais, a facilidade de crescimento do *L. plantarum* somado à rápida obtenção do biopolímero via bioprocessos, alavanca o potencial do produto para a utilização na agricultura, em especial no cultivo orgânico.

Devido à redução significativa da mancha bacteriana, acredita-se que a aplicação de EPS de *L. plantarum* pode ser considerada uma alternativa na proteção de plantas de tomateiro contra a bacteriose.

## 2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

AI, L et al. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 353–357, 2008.

ANTONIAZZI, N; DESCHAMPS, C; BACH, EE. Effect of xanthan gum and allicin as elicitors against *Bipolaris sorokiniana* on barley in field experiments. **Journal of Plant Diseases Protection**, v. 115, p. 104–107, 2008.

AXELROD, BC; CHEESBROUGH, TM; LAASKO, SL. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, v.71, p.441- 451, 1981.

BACH, EE. **Morphological distinction and isozyme of *Bipolaris* spp. and *Drechslera tritici-repentis* in wheat: biochemical aspects in the interactions and resistance induction.** (Dissertação), Universidade de Sao Paulo, São Paulo, 1997.

BACH, EE; BARROS, BC; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivate conidia suspension. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 411-418, 2003.

BAQUE, MA et al. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1255–1267, 2012.

BARBOSA, AM et al. Production and fungal exopolysaccharides applications. **Semina: Exact and Technological Sciences**, Londrina, v. 25, p. 29-42, 2004.

BRADFORD MM. 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.

BOSTOCK, R M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545-580, 2005.

CAMELINI, CM et al. Production of polysaccharide from *Agaricus subrufescens* Peck on solid-state fermentation. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 123-133, 2013.

CARLBERG, C; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v.113, p.488-495, 1985.

CHOUDHARY, DK. Plant growth-promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*. **Biotechnology Letters**, v.33, p.2287-2295, 2011.

CONRATH, U; PIETERSE, CMJ; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 210-216, 2002.

COOLS, HJ; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 273-282, 2002.

COQUEIRO, DS; DI PIERO, RM. Antibiotic activity against *Xanthomonas gardneri* and protection of tomato plants by chitosan. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 337-344, 2011.

COQUEIRO, DS O; MARASCHIN, M; DI PIERO, RMD. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, v. 159(7-8), p. 488-494, 2011.

EBRAHIM, S; USHA, K; SINGH, B. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. p. 1043-1054, 2011.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> Accessed 10 January 2014

FERRAZ, HGM et al. Rhizobacteria induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 3, p.274-283, 2014.

FERREIRA, DF. **SISVAR**, 4.3 (Build 45). Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil. 2003.

FERRI, MG. **Fisiologia vegetal**. São Paulo SP. Pedagogical Publisher and University. 2004.

FEUSSNER, I; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 275-297, 2002.

GAO, QM et al. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 1, p. 1–12, 2015.

GAYLER, S et al. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, v. 18, p. 363-371, 2004.

GE, Y; BI, Y; GUEST, DI. Defence responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 81, p. 13–21, 2013.

GERASIMOVA, NG; PRIDVOROVA, SM; OZERETSKOVSKAYA, OL. Role of l-phenylalanine ammonia lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 103-105, 2005.

GUZZO, SD et al. Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *maniohtis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers of protection in coffee plants



against *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, v. 139, p. 119-128, 1993.

HUANG, TK; MCDONALD, KA. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 168–184, 2009.

KACURÁKOVÁ, M; WILSON, RH. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 291-303, 2001.

KOFALVI, SA; NASSUTH, A. Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 47, p. 365-377, 1995.

LATHA, P et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v.50, n.2, p.85-93, 2009.

LAWS, A; GU, Y; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 597–625, 2001.

LEEMHUIS, H et al Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 250–272, 2013.

LI, S et al. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 7334-43, 2014.

LUIZ, C et al. Polysaccharides from aloe barbadensis reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p.387-393, 2012.

LUIZ, C; ROCHA NETO, AC; DI PIERO, RM. Resistance to *Xanthomonas gardneri* in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, p. 119-127, 2015.

MCCUE, P et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Biochemistry**, v. 35, p. 603–613, 2000.

MELLO, SCM; TAKATSU, A; LOPES, CA. Diagrammatic scale for assessment of tomato bacterial spot. **Brazilian Phytopathology**, v. 22, p. 447-448, 1997.

NOTARARIGO, S et al. Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 57-64, 2013.

OBRADOVIC, A et al. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar application of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**, v. 88, p. 736-740, 2004.

OOSTENDORP, M et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 19–28, 2001.

QUEZADO-DUVAL, A M et al. **Cuidados especiais no manejo da cultura do tomate no verão**. Comunicado Técnico. n. 43. Embrapa Hortaliça, 2007.

RAIOLA, A et al. Enhancing the human-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. **Mediators Inflamm**, p. 1-17, 2014.

RAMAMOORTHY, V; RAGUCHANDER, T; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.429-441, 2002.

ROSELLÓ, G et al. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, p. 621–633, 2013.

SALAZAR, SM et al. Avirulent strain of *Colletotrichum* induces a systemic resistance in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, p. 877-888, 2013.

SEO, B et al. Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 49, p. 282-292, 2015.

SHAN, L; HE, P; SHEEN, J. Endless Hide-and-Seek : Dynamic Co-evolution in Plant-Bacterium Warfare. **Journal Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 105–111, 2007.

SHARMA, P; DUBEY, RS. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 209–221, 2005.

SHARMA, P et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.

SILVA, CMMS; FAY, EF. **Impacto ambiental do fungicida metalaxil**. 96 p. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

SUZUKI, K et al. Elicitor-induced down-regulation of cell cycle-related genes in tobacco cells. **Plant, Cell and Environment**, v. 29(2), p. 183–191, 2006.

TIAN, S et al. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 729–734, 2006.

VAUGHN, KC; DUKE, SO. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiology Plantarum**, v. 60, p. 106–112, 1984.

WALTERS, DR; RATSEP, J; HAVIS, ND. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64(5), p. 1263–1280, 2013.

WANG, Y et al. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 283-288, 2008.

ZHANG, J; ZHOU, JM. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Molecular Plant**. v. 5, p. 783–793, 2010.

### **CAPÍTULO 3 - Exopolissacarídeos de *Lactobacillus plantarum* protegem plantas de tomateiro contra mancha bacteriana por induzirem alterações bioquímicas e fisiológicas**

**Resumo** - O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de exopolissacarídeos (EPS) provenientes de *Lactobacillus plantarum* em controlar a mancha bacteriana e elicitar mecanismos de defesa, bem como verificar alterações no comportamento fisiológico do tomateiro. Plantas de tomateiro foram pulverizadas com EPS ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), água destilada ou ASM ( $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e após 3 dias inoculadas com *Xanthomonas gardneri*. A avaliação quanto a proteção local e sistêmica da doença foi realizada aos 7, 15 e 21 dias após a inoculação. Mecanismos de defesa bioquímicos (peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e alterações fisiológicas (taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, eficiência fotoquímica do fotossistema II e índice SPAD) foram quantificados e aspectos morfológicos por meio de microscopia de luz e fluorescência foram observados a partir de plantas de tomateiro tratadas, inoculadas ou não com *X. gardneri*. Em média, EPS promoveu redução de 55% dos sintomas da bacteriose em folhas que receberam o produto, comparado à testemunha. A atividade de POX não foi alterada após a aplicação do EPS em plantas inoculadas. No entanto, foi observado aumento na atividade de PFO, CAT e SOD em plantas tratadas com o EPS seguidas do desafio com o patógeno. A taxa fotossintética foi alterada nas plantas previamente pulverizadas com EPS e desafiadas com o patógeno, apresentando-se três vezes maior que a das plantas controle inoculadas. Em média, o biopolímero reduziu a condutância estomática e a transpiração dos vegetais em torno de 36%. Os parâmetros de eficiência fotoquímica do fotossistema II e o índice SPAD não foram alterados com a aplicação do EPS. A aplicação do EPS proporcionou alterações nas enzimas antioxidantes e fisiologicamente contribuiu para o fechamento estomático, podendo ser considerada uma alternativa para o controle da mancha bacteriana e seu modo de ação é discutido em termos das alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas de tomate.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de defesa de uma planta, sejam eles estruturais ou bioquímicos, são controlados geneticamente e dependem da expressão de genes específicos no momento adequado após o contato do patógeno com o hospedeiro. A oportunidade de ativação desses genes pode tornar as plantas mais resistentes aos patógenos, fenômeno esse conhecido como indução de resistência (IR) em plantas (LOUWS e WILSON, 2001; STANGARLIN et al., 2011).

A resistência induzida acontece por meio de agentes externos e visa o aumento do nível de resistência da planta contra determinados patógenos, sem a modificação do genoma da mesma. A expressão da resistência induzida, tanto no local da infecção quanto sistêmica, é desencadeada pelo reconhecimento de moléculas bióticas ou abióticas (VAN LOON, 1997; BARROS et al., 2010). Nesse processo, os elicitores interagem com os receptores celulares gerando uma série de alterações nos metabolismos primário e secundário, os quais culminarão na ativação de mecanismos de defesa, dentre eles a produção de proteínas envolvidas na patogenicidade, como as peroxidases e polifenoloxidasas, e o aumento na síntese de espécies reativas de oxigênio que podem atuar como compostos antimicrobianos ou provocar a reação de hipersensibilidade, bem como de enzimas antioxidantes que protegem a célula vegetal, a exemplo da superóxido dismutase e catalase, entre outros (HE et al., 2007; LUIZ et al., 2015).

Os elicitores também podem estimular alterações estruturais nas células da epiderme impedindo ou dificultando a entrada do patógeno na planta. Naturalmente, as defesas estruturais como caloses, papilas, lignificação, camadas de cortiça, camada de abscisão, tiloses, entre outros, são formadas após o ataque do patógeno. Na indução de resistência, os sinais desencadeados pelo reconhecimento dos elicitores são capazes de estimular o reforço na parede celular aumentando a deposição desses compostos na parede (HE et al., 2007; WITTSTOCK e GERSHENZON, 2002). O fechamento estomatal é outra medida de proteção que pode ser modulada por fatores bióticos e abióticos. Sabe-se que a presença de moléculas provenientes de patógenos pode levar à redução da condutância e aumento da resistência estomática (HE et al., 2007; GRIMMER et al., 2012). Indutores a base de quitosana extraída de fungos, por exemplo, promoveram o fechamento dos poros responsáveis pelas trocas gasosas em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) e *Commelina communis* (LEE et al., 1999).

No aspecto fisiológico da planta, há outros parâmetros que podem ser estudados para verificar a ocorrência de estresse no vegetal, seja ele causado pelo patógeno ou pelo próprio elicitor. A fluorescência da clorofila *a*, emitida pelo fotossistema II, por exemplo, pode ser utilizada na avaliação do dano ao sistema fotossintético. O principal parâmetro utilizado é a razão Fv/Fm, a qual indica a eficiência fotoquímica do fotossistema II, e que normalmente decresce em plantas submetidas a algum tipo de estresse (KRAUSE e WEIS, 1991). Silva et al. (2015) observaram que plantas de café atacadas por *Meloidogyne paranaensis* apresentaram redução na fluorescência da clorofila *a* e baixo desempenho fotoquímico, os quais culminaram em menor produção. Já Rezende et al. (2013) constataram que fosfito de potássio além de proteger as plantas de faia (*Fagus sylvatica*) contra *Phytophthora plurivora*, desencadeou acréscimos nos valores de fluorescência da clorofila *a*. Os autores concluíram que o indutor de resistência foi capaz de reduzir os danos fisiológicos nas plantas desafiadas com o patógeno, visto que o declínio da relação Fv/Fm é um bom indicador do dano fotoinibitório quando plantas estão sujeitas a estresses bióticos e abióticos.

O agente indutor pode ser um ativador químico, extratos de plantas ou substâncias oriundas de microrganismos. De maneira geral, compostos microbianos como proteínas de vírus encapsulados, proteínas de fungos ou bactérias, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e exopolissacarídeos (EPS) são capazes de induzir resistência em plantas por serem facilmente reconhecidos pela célula vegetal. Estas substâncias chamadas de MAMP's/PAMP's (padrões moleculares associados a microrganismos/ patógenos) são estruturas essenciais, e por esse motivo são conservadas em microrganismos patogênicos, não patogênicos e saprofitos. MAMP's/PAMP's são reconhecidas pelos receptores, que estão localizados na superfície de células de plantas e por isso facilmente induzem diversas respostas de defesa (AUSUBEL, 2005; JONES e DANGL, 2006). Nesse sentido, os EPS secretados por bactérias apresentam relevância no âmbito da IR, pois naturalmente podem ser reconhecidas como MAMP's ou PAMP's pelas plantas (ZHANG e ZHOU, 2010).

De maneira geral, os EPS provenientes do gênero *Lactobacillus* são utilizados na indústria alimentícia como estabilizadores e espessantes. No entanto, atualmente a indústria nutracêutica tem apresentado grande interesse nesse tipo de biopolímero por apresentar

importantes características probióticas, trazer inúmeros benefícios à saúde humana, atuando como agentes imuno-estimulantes. Somado a isto, estudos comprovam que o biopolímero não apresenta toxicidade ao ambiente, sendo geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (DAS e GOYAL, 2014; LEEMHUIS et al., 2013; NOTARARIGO et al., 2013; SEO et al., 2015).

Os EPS de *L. plantarum*, além de naturalmente abundantes, são passíveis de produção em larga escala por meio de bioprocessos, demonstrando alto potencial mercadológico (PATEL et al., 2012; WELMAN e MADDIX, 2003), e a sua utilização na agricultura poderia ser uma alternativa ao controle convencional de doenças, como por exemplo, as causadas por bactérias. A mancha bacteriana do tomateiro, causada por espécies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria*) causa muitos prejuízos aos produtores. A maioria das cultivares apresenta alta suscetibilidade e a tentativa de controle com o uso de cúpricos ou antibióticos agrícolas têm proporcionado pouco sucesso, promovendo a seleção de isolados resistentes, além da contaminação ambiental (OBRADOVIC et al., 2005; SILVA e FAY, 2006; JONES, 2011; ARAÚJO et al., 2015).

Buscando-se medidas alternativas para o manejo dessa doença, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do EPS proveniente de *L. plantarum* em controlar a mancha bacteriana e estudar o modo de ação do polissacarídeo, verificando alterações bioquímicas e morfo-fisiológicas relacionadas à defesa nas folhas de tomateiro.



## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Condições de cultivo do tomateiro e manutenção do patógeno

Sementes comerciais de tomate da variedade Santa Cruz Kada (Paulista), adquiridas da empresa ISLA Sementes Ltda., foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>. Passados 15 dias da semeadura, duas plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 2 L, adicionados de terra preta, recebendo adubações com uréia (4,0 g L<sup>-1</sup>) e Eurofit<sup>®</sup> (3,8 ml L<sup>-1</sup>) a cada 15 dias. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação à temperatura média de 28 ± 3 °C.

A bactéria *X. gardneri*, cedida pela Empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA, SAKATA<sup>®</sup>, e identificada junto à Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, foi preservada em tampão fosfato (8.6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 7.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). As repicagens foram realizadas em meio nutriente ágar (NA, 28 g L<sup>-1</sup>, Merck, Darmstadt, Alemanha) e as placas incubadas a 25 °C, durante 48h. A suspensão bacteriana foi obtida pela adição de água destilada ao meio de crescimento e a concentração ajustada para 0,6 unidades de absorvância (U.A.) com leitura a 600 nm (LUIZ et al., 2012; LUIZ et al., 2015).

### 3.2.2. Obtenção e caracterização do EPS de *Lactobacillus plantarum*

O isolado de *L. plantarum* (CCT 0580, ATCC 8014) foi adquirido junto à Coleção Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, SP). Para o cultivo da bactéria ácido-lática foi utilizado o soro de tofu (fornecido pela empresa Tofutura Indústria de Alimentos Ltda), suplementado com glicose (11,5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (1 g L<sup>-1</sup>), citrato de sódio (3 g L<sup>-1</sup>), Tween 80 (1 mL L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,4 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (0,2 g L<sup>-1</sup>), e MnSO<sub>4</sub> (0,05 g L<sup>-1</sup>). O inóculo contendo células com 48 h de crescimento foi armazenado em glicerol estéril 2%, a -80 °C.

A ativação da bactéria foi realizada de forma escalonada onde 2 mL do inóculo inicial foram acrescentados em caldo nutriente, num volume final de 20 mL, com incubação a 30 °C por 18h. Na etapa seguinte, os 20 mL de inóculo foram transferidos para frascos contendo meio de soro de tofu (200 mL de volume final), com nova incubação a 30 °C por 18h. Para viabilizar e padronizar a produção de EPS, o cultivo

de *L. plantarum* foi realizado em biorreator *airlift* (200 mL do inóculo em 4,8 L de meio de cultura) com parâmetros controlados.

No biorreator o cultivo foi conduzido por 30 h, e os parâmetros de vazões específicas de ar (0.2 a 1.3 vvm; volume de ar por volume de meio por minuto), pH (5,9 a 6,1) e temperatura (30 °C) foram mantidos automaticamente e registrados pelo programa BRF.vi, baseado em LabView®, e desenvolvido especificamente para o biorreator *airlift*.

Para a obtenção do EPS, o meio de cultivo foi centrifugado (2000 rpm por 20 min) e, no filtrado livre de células, o EPS foi separado por nanofiltração, seguido de rotaevaporação e liofilização do material (CAMELINI et al., 2013).

### **3.2.3. Indução de proteção local e sistêmica contra a mancha bacteriana**

O EPS foi pulverizado em plantas de tomateiro na concentração de 1,5 mg mL<sup>-1</sup> quando estas apresentavam cinco folhas. A aplicação foi feita em toda parte aérea das plantas, com exceção das duas folhas mais jovens de cada planta, que foram cobertas com saco plástico, para posterior verificação de proteção sistêmica. A inoculação com *X. gardneri* foi realizada em todas as folhas 3 dias após a aplicação do produto. Foram utilizados 10 mL de inóculo por planta, os quais foram aspergidos com auxílio de uma pistola de pintura (LPHV, pressão máxima 58 psi, bico 0.7 mm de diâmetro, marca Grifo, Itália) acoplada a um compressor de ar (marca Schulz, Brasil; pressão de 251bf/pol<sup>2</sup>; potência de 180W; vazão de 105 mL min<sup>-1</sup>). A concentração do inóculo de *X. gardneri* foi ajustada em espectrofotômetro (DO<sub>600nm</sub> = 0,6; correspondente à 10<sup>8</sup> UFC) e após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida durante 48 h, a fim de favorecer o estabelecimento da bactéria.

Os experimentos foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um vaso contendo duas plantas. A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 7, 15 e 21 dias após a inoculação das plantas por escala diagramática para mancha bacteriana descrita por Mello et al. (1997) (Anexo A).

Água destilada e o indutor de resistência registrado para tomateiro contra mancha bacteriana, Acibenzolar-S-metil (ASM), a 0,05 mg mL<sup>-1</sup>, foram utilizados como controle negativo e positivo,

respectivamente. O ASM foi obtido a partir do Bion<sup>®</sup>, fornecido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., São Paulo, SP.

### **3.2.4. Amostragem para análises bioquímicas, fisiológicas e morfológicas**

Plantas de tomateiro com cinco folhas definitivas foram pulverizadas com EPS de *L. plantarum* (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ASM (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) ou água destilada (controles), 3 dias antes da inoculação com a suspensão bacteriana de *X. gardneri* (DO<sub>600nm</sub> = 0,6). Amostras foliares foram coletadas aos 0, 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos produtos. Foram amostradas a segunda, terceira e quarta folha de plantas pulverizadas com o produto, inoculadas ou não com *X. gardneri*, totalizando cinco repetições para cada tratamento. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos transparentes com fecho zip, colocadas em contato com nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer (-80°C), até o momento do seu processamento.

As amostras foram processadas para a avaliação da atividade de peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), bem como para a determinação de parâmetros fisiológicos (taxa de fotossíntese, condutância estomática, transpiração, máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II e índice SPAD). A análise morfológica foi realizada por meio de microscopia de luz.

#### **3.2.4.1. Atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, superóxido dismutase e catalase**

Amostras foliares (pool das folhas amostradas, aproximadamente 100 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Ao macerado, foram adicionado 1,5 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,0) contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), 1 % de polivinilpirrolidona (PVP), e 1mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) (Luiz et al., 2012). O extrato resultante foi centrifugado a 20.000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante (extrato proteico) recuperado.

A atividade das peroxidases foi determinada conforme metodologia de Hammerschmidt et al. (1982), com adaptações.

Utilizou-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato proteico em 290  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (50 mM, pH 6.0) contendo guaiacol (20,2 mM) e peróxido de hidrogênio (90 mM). Avaliou-se a atividade enzimática por meio do método espectrofotométrico, medindo-se a conversão do guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi conduzida por 4 minutos a 40 °C, com os valores de DO sendo anotados a cada 30 s. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470 nm por mg de proteína por minuto ( $\text{DO}_{470\text{nm}} \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ).

Para a reação das polifenoloxidasas, adicionou-se uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  do extrato proteico em 240  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 60 mM (pH 6,0) contendo catecol 60 mM. A atividade enzimática foi avaliada por espectrofotometria, onde mensurou-se a oxidação do catecol convertido em quinona. A reação foi conduzida por 1 min a 40 °C, com os valores de DO sendo anotados a cada 3 s. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 420 nm por mg de proteína por minuto ( $\text{DO}_{420\text{nm}} \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (DUANGMAL e APENTEM, 1999).

A atividade de superóxido dismutase foi determinada pela adição de 10  $\mu\text{L}$  do extrato proteico a 290  $\mu\text{L}$  do tampão fosfato (50 mM, pH 7.8) contendo 13 mM de metionina, 75 mM de NBT, 100 mM de EDTA, e 2 mM de riboflavina. A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por luz fluorescente (15W), e foi conduzida por 5 min a 25 °C. O composto azul formado (formazana) pela fotoredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560 nm (GIANNOPOLITIS e RIES, 1975).

Os tubos considerados brancos para a análise receberam os mesmos reagentes, porém foram cobertos com papel alumínio. A atividade específica foi expressa em Unidade de SOD  $\text{min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ , sendo 1 unidade de SOD considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorvância.

A atividade da enzima catalase foi determinada pelo monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, conforme Peixoto et al. (1999). Para tanto, 15  $\mu\text{L}$  de extrato proteico foram adicionados a 285  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7) suplementado com peróxido de hidrogênio a uma concentração final de 12,5 mM. A reação foi conduzida por 1 minuto a 40 °C, com os valores de DO sendo anotados a cada 10 s. A atividade específica foi expressa em Unidades de CAT  $\text{min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ , sendo 1 unidade de CAT considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorvância.

Para todas as amostras, realizou-se a dosagem de proteínas totais conforme o método de Bradford, (1976).

### **3.2.4.2. Taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, índice SPAD e rendimento fotoquímico do fotossistema II**

Plantas de tomateiro com 5 folhas definitivas foram pulverizadas com EPS (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ASM (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) ou água destilada. Passados 3 dias da aplicação do produto foi realizada a inoculação com *X. gardneri* (DO<sub>600nm</sub> = 0,6). Verificou-se a taxa de assimilação fotossintética (mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), a condutância estomática (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e a transpiração (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), com auxílio do analisador de gás por infravermelho (Licor Li 6400 XT Portable Photosynthesis System) aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos produtos. A Densidade de Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos (DFFFA) foi fixada em 1000 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Os parâmetros de máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (razão Fv/Fm) foram determinados com o fluorímetro portátil de luz modulada MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Dentre esses, as fluorescência mínima (F0) e máxima (Fm) foram determinadas em folhas adaptadas ao escuro por meia-hora. As leituras, para obtenção das variáveis Y (II) (rendimento fotoquímico do fotossistema II, F0 (fluorescência mínima), Fm (fluorescência máxima), e rendimento quântico máximo (Fv/Fm) foram realizadas nas mesmas folhas em que foram realizadas as trocas gasosas (HENRIQUES, 2009).

O índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) foi utilizado para avaliar, quantitativamente, o teor de clorofila da folha. Para tanto, o medidor portátil SPAD-502 (Minolta) foi utilizado. O cálculo do índice SPAD foi baseado na medição de transmissão de luz 650 nm, onde ocorre a absorção de luz pela molécula de clorofila, e a 940 nm, onde não ocorre absorção. O índice SPAD foi determinado nas mesmas folhas que foram realizadas as avaliações dos demais parâmetros fisiológicos.

Os parâmetros fisiológicos foram tomados da segunda, terceira e quarta folhas, sendo verificados 3 pontos ao acaso por folha. Com seis repetições por tratamento (cada repetição representada por uma planta), observou-se no total 54 amostragens por tratamento/data de avaliação.

### 3.2.4.3. Microscopia de luz e fluorescência

Para a microscopia de luz e fluorescência foram utilizadas plantas de tomateiro com 5 folhas definitivas pulverizadas com EPS ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), ASM ( $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ou água destilada. A amostragem foi realizada aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Três discos foliares ( $\varnothing = 5,0 \text{ mm}$ ), coletados aleatoriamente, foram fixados em paraformaldeído (2,5%) e tampão fosfato (0.1 M; pH 7.2) de acordo com a descrição feita por Schmidt et al. (2009). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de soluções aquosas de etanol e infiltradas com Histo-resina (Leica Histo-resin, Heidelberg, Alemanha). Depois de seccionados em micrótomo, seis segmentos ( $5 \mu\text{m}$ ) foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS) para identificar os polissacarídeos neutros e safranina (1%) para identificar paredes cutinizadas, lignificadas e suberizadas, analisados com auxílio de microscópio de epifluorescência (Olympus BX 41) equipado com sistema de captura de imagem Q Capture Pro 5.1 software (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA) (BOUZON e SCHMIDT et al., 2012). A fluorescência dos componentes das células das amostras foi observada em lâminas que não passaram por colorações histoquímicas, em microscópio de luz invertida (Olympus IX-81) equipado com sistema de fluorescência (Olympus U-RFL-T), na luz UV (excitação de 340 a 380 nm com filtro de barreira de 430 nm; 23,85 ms de tempo de exposição) e luz azul (excitação de 450 a 490 nm com filtro de barreira de 515 nm; 8,478 ms de tempo de exposição).

### 3.2.4.4. Reação de Hipersensibilidade

Para a reação de hipersensibilidade foram utilizadas plantas de tomateiro com 5 folhas definitivas pulverizadas com EPS ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), ASM ( $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ou água destilada. A amostragem foi realizada aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Cinco discos foliares ( $\varnothing = 5,0 \text{ cm}$ ), coletados aleatoriamente, foram incubados em placas de Petri ( $\varnothing = 5,0 \text{ cm}$ ) contendo 5 mL de solução de 3,3 – diaminobenzidíia (DAB, Sigma, EUA) a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , por 8 h. Após a incubação, foram submetidos ao clareamento em etanol fervente (96 %; 30 min) e transferidos para solução de conservação (ácido láctico: glicerol: água, 1:1:1, v/v/v) (THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1997). Após esses procedimentos, o material foi montado em lâminas de vidro e visualizado em microscópio óptico (modelo FWL1500T, Feldmann

Wild Leitz, Brasil) no aumento de 400x. O número de células apresentando reação de hipersensibilidade/acúmulo de peróxido de hidrogênio foi avaliado em toda a superfície dos discos foliares, e em seguida foi transformado para número de células com RH/cm<sup>2</sup>. O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco discos foliares.

### **3.2.5. Análise estatística**

A análise de variância (ANOVA *one way* ou fatorial) e o teste de Tukey foram realizados para verificar a diferença entre as médias das variáveis analisadas nos experimentos. As análises foram realizadas por meio do software estatístico Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Proteção local e sistêmica sobre a severidade da mancha bacteriana

O EPS obtido de *L. plantarum* restringiu significativamente o desenvolvimento da mancha bacteriana nas plantas de tomateiro. Observou-se que a pulverização do produto reduziu a severidade da mancha bacteriana nas folhas previamente tratadas (proteção local) em todos os tempos de avaliação. Aos 7 dias após a inoculação, as folhas tratadas com EPS apresentaram 77% de redução da severidade da doença comparado à testemunha. Nas demais datas de avaliação, aos 15 e 21 dias após a inoculação, observou-se uma redução de 50% e 38%, respectivamente (Tabela 9A).

Por outro lado, o EPS não alterou significativamente a severidade da bacteriose nas folhas mais jovens do tomateiro, indicando ausência de proteção sistêmica. Já as plantas tratadas com o indutor comercial (ASM) apresentaram redução dos sintomas da mancha em aproximadamente 94%, promovendo tanto proteção local como sistêmica (Tabela 9B).



**Tabela 9** - Avaliação da proteção local (A) e sistêmica (B) de plantas de tomate contra a mancha bacteriana a partir da aplicação de EPS de *L. plantarum*, ASM ou água, aos 3 dias antes da inoculação com *X. gardneri* ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A severidade da doença foi avaliada aos 7, 15 e 21 dias após a inoculação das plantas (DAI).

<b>A.</b> Tratamentos/ Avaliações	<b>Severidade (%)</b>		
	<b>7 DAI</b>	<b>15 DAI</b>	<b>21 DAI</b>
<b>Água</b>	13,57±2,44Ab	17,32±5,52Ab	32,57±5,55Aa
<b>EPS Lac</b>	3,07±1,69Bb	8,61±2,89Bb	19,14±4,63Ba
<b>ASM</b>	0,25±0,14Cb	0,43±0,21Ca	1,60±0,45Ca
<b>B.</b> Tratamentos/ Avaliações	<b>Severidade (%)</b>		
	<b>7 DAI</b>	<b>15 DAI</b>	<b>21 DAI</b>
<b>Água</b>	13,57±3,49Ab	20,71±4,50Ab	33,57±8,99Aa
<b>EPS Lac</b>	13,93±3,78Ab	16,96±3,94Ab	29,28±6,72Aa
<b>ASM</b>	1,07±0,98Ba	1,40±1,04Ba	1,53±0,42Ba

ASM=Acibenzolar-S-metil (0,05 mg mL<sup>-1</sup>). Letras maiúsculas idênticas na coluna e letras minúsculas idênticas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

### 3.3.2. Atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, superóxido dismutase e catalase

Logo antes da inoculação, ou seja, três dias após a aplicação do EPS de *L. plantarum*, não foram observadas alterações significativas na atividade da peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (dados não mostrados). Da mesma forma, plantas tratadas com ASM não apresentaram alterações nas atividades enzimáticas da POX. No entanto, foi observada redução significativa na atividade da CAT e incremento na atividade da PFO e da SOD nas plantas pulverizadas com o indutor comercial antes da inoculação (dados não mostrados).

Após a inoculação do patógeno, foi possível observar alterações em todas as enzimas analisadas. Dois dias após a inoculação, somente as plantas tratadas com ASM apresentaram atividade da POX alterada, cerca de 38% maior do que o controle. No quarto dia após a inoculação,

a atividade da peroxidase nas plantas tratadas com o ASM mantiveram a mesma tendência (Tabela 10).

Em relação à atividade da PFO, as plantas previamente tratadas com EPS apresentaram ligeira redução na atividade enzimática após dois dias da introdução do patógeno. Por outro lado, quatro dias após a inoculação, plantas previamente pulverizadas com EPS e ASM apresentaram alterações positivas em relação a PFO, com aumento na atividade da enzima em cerca de 40% e 50%, respectivamente, em comparação ao controle.

Após dois dias da inoculação, também observou-se alteração na atividade da CAT. Em plantas previamente pulverizadas com ASM, o incremento na atividade desta enzima foi em torno de 20% em relação ao controle. Por outro lado, aos quatro dias após o desafio com o agente causal da mancha bacteriana, plantas tratadas com EPS e inoculadas apresentaram acréscimo de 30% na atividade da CAT em relação ao controle inoculado.

No primeiro período de avaliação após inoculação, plantas desafiadas com o patógeno apresentaram maior atividade de SOD, em relação às não inoculadas, porém não houve diferença significativa dos produtos. Contudo, passado quatro dias do desafio bacteriano, as plantas previamente pulverizadas com EPS e ASM exibiram atividade da SOD cerca de 30% superior ao controle inoculado.

**Tabela 10** - Atividade de peroxidases (POX), polifenolxidasas (PFO), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ASM (Acibenzolar-S-Metil; 0,05 mg mL<sup>-1</sup>) ou água, inoculadas (INOC) ou não (IN) com a *Xanthomonas gardneri* (DO<sub>600nm</sub> = 0.6).

Tratamentos	POX		PFO	
	DO <sub>470nm</sub> mg proteína <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>		DO <sub>420nm</sub> mg proteína <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	
	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)
Água NI	3,04±1,11b	3,08±0,87b	4,08±1,41bc	5,34±0,93b
EPS Lac NI	3,24±1,06ab	2,25±1,02b	5,67±0,23ab	4,722±0,77b
ASM NI	3,13±1,69b	3,93±1,32b	5,77±0,27a	5,637±0,63b
Água INOC	3,56±0,30ab	2,46±0,098b	5,57±0,24abc	5,506±0,07b
EPS Lac INOC	2,12±0,31b	3,87±1,43b	4,02±0,38c	8,528±0,80a
ASM INOC	5,73±0,72a	7,40±1,10a	4,98±0,88abc	7,910±0,96a

Tratamentos	CAT		SOD	
	U µg proteína <sup>-1</sup>		U µg proteína <sup>-1</sup>	
	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)
Água NI	2,63±0,41c	2,71±0,27abc	2,18±0,03b	1,81±0,14b
EPS Lac NI	2,25±0,30c	2,20±0,48c	2,41±0,11b	1,43±0,14b
ASM NI	2,50±0,29c	1,95±0,71c	2,40±0,34b	1,77±0,11b
Água INOC	3,38±0,32b	2,57±0,36bc	3,26±0,14a	1,87±0,21b
EPS Lac INOC	3,55±0,20b	3,68±0,23a	3,40±0,19a	2,60±0,23a
ASM INOC	4,44±0,41a	3,47±0,36ab	3,31±0,27a	2,48±0,27a

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Letras idênticas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

### 3.3.3. Taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, índice SPAD e rendimento fotoquímico do fotossistema II

No primeiro período de amostragem, ou seja, três dias após a aplicação dos tratamentos e antes da inoculação, os parâmetros fisiológicos avaliados não se apresentaram alterados nas plantas pulverizadas com EPS. Contudo, plantas pulverizadas com ASM apresentaram a taxa fotossintética alterada, cerca de duas vezes maior do que a taxa apresentada nas plantas pulverizadas com água destilada (dados não mostrados).

Após a inoculação do patógeno, observou-se redução significativa na taxa fotossintética das plantas, independente do tratamento prévio. Contudo, quatro dias após o desafio bacteriano,

plantas aspergidas com EPS ou ASM seguidas de inoculação apresentaram uma taxa fotossintética cerca de 50% maior do que a taxa nas plantas controle inoculadas (Tabela 11).

A condutância estomática das folhas de tomateiro foi alterada após cinco dias da aplicação dos tratamentos. Nesse período, plantas apenas pulverizadas com EPS aumentaram a condutância estomática em cerca de 80% comparado ao controle. Com a inoculação do patógeno observaram-se alterações significativas nesse parâmetro em plantas tratadas com EPS e ASM. As plantas que receberam os produtos e foram inoculadas apresentaram redução na condutância de 36% e 18% (dois dias após a inoculação), respectivamente, comparado ao controle inoculado (Tabela 11).

A transpiração das folhas de tomateiro teve comportamento semelhante à condutância estomática. Nesse caso, cinco dias após a pulverização com EPS, plantas não desafiadas com o patógeno apresentaram aumento da troca gasosa duas vezes maior que as plantas controle. Nesse período, após a inoculação, plantas previamente tratadas com EPS foram as que apresentaram menor perda de água na forma de vapor das folhas, em torno de 29% menor se comparado ao controle inoculado, porém os valores mantendo-se semelhante aos encontrados nas plantas controle não inoculadas.

Em relação ao teor de clorofila estimado pelo índice SPAD não observou-se alterações significativas em plantas tratadas com EPS ou ASM. Mesmo após a inoculação do agente patogênico, os teores de clorofila mantiveram-se inalterados.

**Tabela 11** - Taxa de assimilação fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), transpiração (*E*) e índice de clorofila (Índice SPAD) de folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ASM (Acibenzolar-S-Metil; 0,05 mg mL<sup>-1</sup>) ou água, inoculadas (INOC) ou não (IN) com a *Xanthomonas gardneri* (DO<sub>600nm</sub> = 0.6).

Tratamentos	Fotossíntese líquida mmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>		Condutância estomática mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	
	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)
	Água NI	13,39±1,32a	11,20±1,07ab	0,13±0,01d
EPS Lac NI	14,08±1,16a	13,51±1,61a	0,25±0,02a	0,14±0,03ab
ASM NI	15,39±2,50a	9,85±1,00b	0,17±0,02bc	0,12±0,01b
Água INOC	8,22±1,39b	6,38±1,44c	0,19±0,01b	0,17±0,02ab
EPS Lac INOC	8,47±2,38b	9,81±0,76b	0,12±0,01d	0,16±0,01ab
ASM INOC	8,05±1,83b	9,26±1,89b	0,16±0,02bc	0,19±0,02a

Tratamentos	Transpiração mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>		Índice de clorofila Índice SPAD	
	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)
	Água NI	3,65±0,70c	3,70±0,70 b	28,78±2,62 <sup>ns</sup>
EPS Lac NI	7,90±0,50a	4,24±0,70b	28,01±0,39	26,50±0,68
ASM NI	6,11±0,50b	3,73±0,10b	29,38±2,50	25,75±1,14
Água INOC	5,89±0,20b	4,84±0,50ab	28,60±2,54	25,83±2,36
EPS Lac INOC	4,18±0,50c	4,65±0,70ab	29,09±1,83	26,30±1,91
ASM INOC	4,89±0,60bc	5,94±0,50a	27,83±0,22	26,69±1,84

5 e 7 dat corresponde a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Letras idênticas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

<sup>ns</sup> Não observou-se diferença estatística pelo teste F (p < 0,05).

O rendimento quântico do fotossistema II, a fluorescência mínima e máxima da clorofila *a* e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II também mostraram-se inalterados após três dias da aplicação dos produtos (dados não mostrados). Nas demais datas de avaliação foram observadas sutis alterações nos parâmetros referentes à fluorescência da clorofila *a* (Tabela 12). O rendimento quântico do fotossistema II foi influenciado negativamente aos dois dias após a inoculação do agente causal da mancha bacteriana. Nesse período

observou-se que as plantas tratadas com EPS e as plantas controle, ambas desafiadas, apresentaram os menores valores no parâmetro em questão. Entretanto, com o passar do tempo as plantas pulverizadas com ASM apresentaram redução significativa no rendimento quântico, na presença ou não do patógeno.

Passado dois dias da inoculação observou-se redução de 3% da fluorescência mínima da clorofila em plantas tratadas com ASM comparado ao controle inoculado. Passado sete dias da aplicação dos tratamentos, plantas pulverizadas com EPS ou ASM apresentaram cerca de 1% de aumento da fluorescência mínima. Neste mesmo período, plantas inoculadas apresentaram decréscimos no parâmetro analisado. No entanto, plantas previamente tratadas com ASM apresentaram os menores valores, similares ao respectivo controle.

**Tabela 12** - Análise do rendimento quântico do fotossistema II (Y), fluorescência mínima (F0), fluorescência máxima (Fm) e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) em folhas de tomateiro aos 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ASM (Acibenzolar-S-Metil; 0,05 mg mL<sup>-1</sup>) ou água, inoculadas (INOC) ou não (IN) com a *Xanthomonas gardneri* (DO<sub>600nm</sub> = 0.6).

Tratamentos	Y(II)		F0	
	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)
Água NI	0,815±0,003a	0,818±0,003a	565,44±3,35a	577,07±3,11b
EPS Lac NI	0,817±0,002a	0,816±0,002a	560,62±4,02a	586,34±3,53a
ASM NI	0,808±0,006ab	0,807±0,002b	557,51±5,43a	584,32±2,32a
Água INOC	0,805±0,003b	0,812±0,002a	566,07±4,30a	556,29±4,04c
EPS Lac INOC	0,805±0,004b	0,814±0,004a	562,68±3,79a	577,38±1,88b
ASM INOC	0,810±0,007ab	0,804±0,003b	544,18±2,45b	552,31±5,69c

Tratamentos	Fm		Fv/Fm	
	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)	2 DAI (5 dat)	4 DAI (7 dat)
Água NI	2958,64±14,45b	3174,14±30,11a	0,807±0,006b	0,818±0,001a
EPS Lac NI	3069,14±26,95a	3134,01±19,45a	0,817±0,002a	0,814±0,003a
ASM NI	2883,93±36,45c	3022,53±14,79b	0,809±0,004b	0,809±0,005ab
Água INOC	2927,51±49,29bc	3086,99±21,59b	0,802±0,004b	0,811±0,001ab
EPS Lac INOC	2885,27±18,94c	3036,49±25,90b	0,802±0,003b	0,808±0,002b
ASM INOC	2855,22±22,26c	2802,04±28,23c	0,808±0,002b	0,803±0,002c

5 e 7 dat correspondem a aos 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Letras idênticas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

Para a fluorescência máxima observou-se que aos cinco dias após o tratamento, plantas pulverizadas com EPS apresentaram aumento de 3% em relação as plantas controle. Nesse mesmo tempo de análise, observou-se que a aplicação de ASM e a inoculação do patógeno reduziram consideravelmente a máxima fluorescência da clorofila *a*. Situação similar foi observada aos sete dias após a aplicação dos tratamentos, onde plantas tratadas com ASM sem o desafio bacteriano apresentaram 4,7% de redução no parâmetro em questão, índice esse semelhante ao encontrado nas plantas que passaram pelo desafio bacteriano. Entretanto, plantas tratadas com ASM seguidas de inoculação (aos quatro dias após inoculação) apresentaram redução de 9,2% da fluorescência máxima comparado as plantas controle inoculadas.

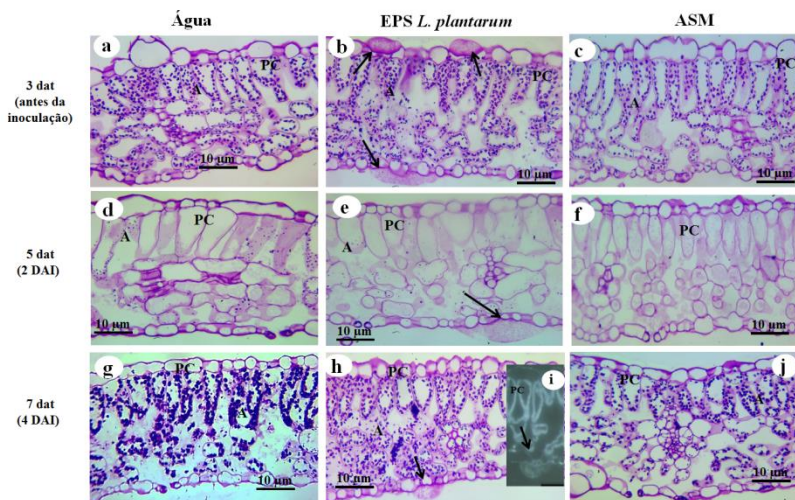
Cinco dias após a pulverização, apenas as plantas que receberam o EPS não inoculadas apresentaram valores da máxima eficiência do fotossistema superior às demais, cerca de 1,2% maior que as plantas controle. Plantas que receberam a aplicação do ASM seguidas da inoculação apresentaram redução de 1,8% nesse parâmetro na última avaliação.

### **3.3.4. Microscopia de luz e fluorescência**

As secções transversais de amostras de folhas de tomateiro coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) apresentaram uma reação PAS positiva nas paredes celulares indicando a presença de celulose (Figura 6). Essa reação ocorreu também no citoplasma com os polissacarídeos neutros, evidenciando a presença de grande quantidade de grãos de amido. Com a reação de PAS também foi possível detectar um acúmulo de compostos celulósicos na superfície das células da epiderme, somente nas folhas tratadas com EPS, antes e após a inoculação da *X. gardneri*, quando comparada com o controle (Figura 6 b, e, h, setas).



**Figura 6** - Microscopia de luz de secções transversais de folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos (dat) com água (a,d,g), EPS de *Lactobacillus plantarum* (1,5 mg mL<sup>-1</sup>) (b,e,h,i), ou ASM (Acibenzolar-S-Metil; 0,05 mg mL<sup>-1</sup>) (c,f,j), e inoculadas com *Xanthomonas gardneri* (DO<sub>600nm</sub> = 0,6) aos 3 dat. Amostras coradas com ácido periódico de Schiff (PAS).

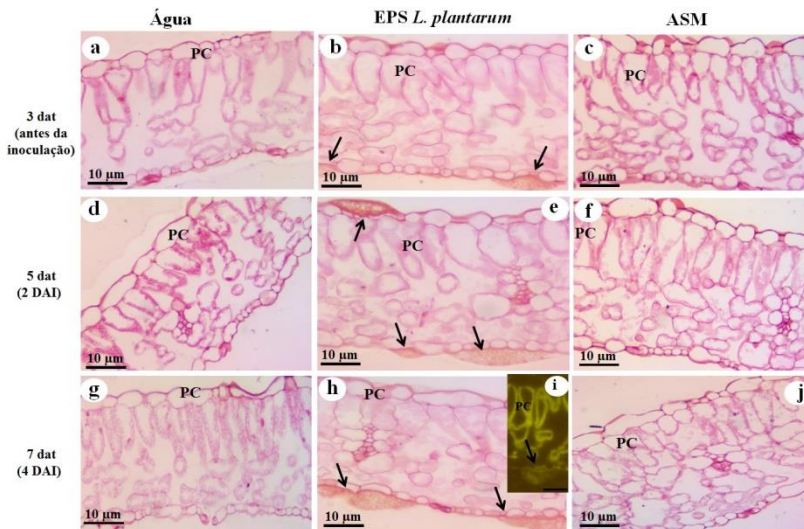


5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. No detalhe (i), autofluorescência com excitação de luz ultravioleta 350 nm. Acúmulos de compostos na parece celular (seta).

O mesmo padrão de reação foi observado com a coloração de safranina (Figura 7). As secções transversais de folha de tomateiro coradas com safranina apresentaram reação forte nas paredes celulares. Com a safranina pode-se observar um acúmulo de compostos que estão formando um processo de calose nas células das folhas tratadas com EPS, antes e depois do desafio com o fitopatógeno, quando comparada com o controle (Figura 7b, e, h, setas).

Pela microscopia de fluorescência pode-se confirmar que os acúmulos de compostos celulósicos na superfície das células da epiderme das folhas tratadas com EPS tratam-se de substâncias que emitem autofluorescência similar às que estão envolvidas no processo de formação de calose (Figura 6i e 7i).

**Figura 7** - Microscopia de luz de secções transversais de folhas de tomateiro aos 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos (dat) com água (a,d,g), EPS de *Lactobacillus plantarum* ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (b,e,h,i), ou ASM (Acibenzolar-S-Metil;  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (c,f,j), e inoculadas com *Xanthomonas gardneri* ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ ) 3 dat. Amostras coradas com safranina.

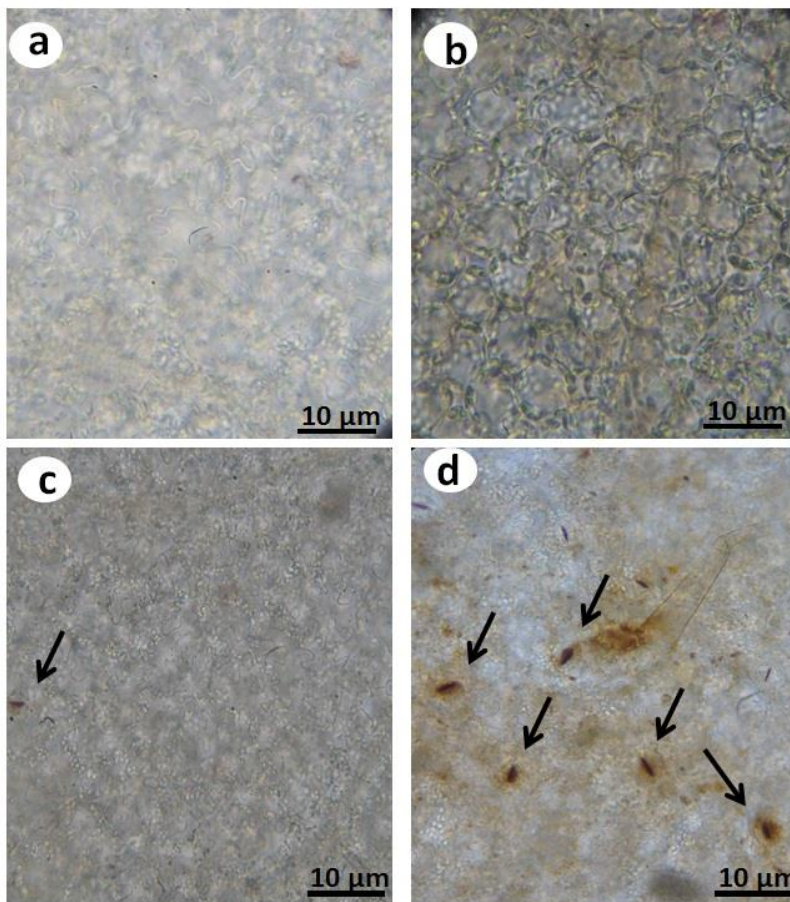


5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. No detalhe (i), autofluorescência com excitação de luz azul 430nm. Acúmulos de compostos na parede celular (seta).

### 3.3.5. Reação de hipersensibilidade

Não foram observadas células epidérmicas e do mesófilo com acúmulo de peróxido de hidrogênio ou reação de hipersensibilidade nas plantas tratadas ao longo do tempo. Contudo, verificou-se um número elevado de células estomáticas (ostíolo e células-guardas) com acúmulo dessa espécie ativa de oxigênio em plantas tratadas com EPS de *L. plantarum*, ou ASM, mesmo antes da inoculação do patógeno (Figura 8 e Tabela 13).

**Figura 8** - Fotomicrografias de folhas de tomateiro aos 7 dias após os tratamentos com água ou EPS de *Lactobacillus plantarum* ( $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), inoculadas com *Xanthomonas gardneri* ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ ). Amostras coradas com 3,3 – diaminobenzidine (DAB).



Células epidérmicas da face abaxial (a), células do mesófilo da folha (b), célula estomática com acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (seta), planta controle inoculado (c), e células estomáticas com acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (setas), planta tratada com EPS e inoculadas (d).

Após 2 dias da inoculação do patógeno, plantas previamente tratadas com EPS e ASM apresentaram elevado acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células estomáticas comparado às do controle. Passados quatro dias do desafio bacteriano, observou-se que a

inoculação desencadeou um maior acúmulo de espécies reativas. Adicionalmente, plantas que haviam recebido EPS ou ASM apresentaram número maior de células estomáticas com acúmulo de peróxido de hidrogênio que nas testemunhas (Tabela 13).

**Tabela 13** - Número de células estomáticas com acúmulo de peróxido de hidrogênio/cm<sup>2</sup> na face abaxial de folhas de tomate aos 3, 5 e 7 dias após os tratamentos (dat) com EPS de *Lactobacillus plantarum* (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ASM (Acibenzolar-S-Metil; 0,05 mg mL<sup>-1</sup>), ou água, inoculadas (Inoc) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri* (DO<sub>600nm</sub> = 0,6).

Tratamentos	Acúmulo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em células estomáticas/cm <sup>2</sup>		
	3 dat (antes inoc)	5 dat (2 DAI)	7 dat (4 DAI)
Água NI	0,627±0,194b	1,388±0,267b	1,266±0,245d
Eps Lac NI	1,442±0,295a	1,555±0,254b	1,583±0,333d
ASM NI	1,277±0,336a	1,499±0,381b	1,781±0,178d
Água INOC	-	2,027±0,625b	3,583±0,763c
EPS Lac INOC	-	3,861±0,625a	5,927±0,239b
ASM INOC	-	4,887±0,586a	6,946±0,493a

5 e 7 dat correspondem a 2 e 4 DAI (dias após a inoculação), respectivamente. Letras idênticas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

### 3.4. DISCUSSÃO

As plantas são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP's) e assim respostas relacionadas à defesa vegetal são desencadeadas. O sinal gerado ativa rapidamente mecanismos latentes resultando na redução da severidade das doenças. Diversos MAMP's têm sido estudados para proteção de plantas. Hael-Conrad et al. (2015) observaram que uma proteína extracelular secretada por *Acremonium strictum* (AsEs) induziu resistência local e sistêmica em plantas de *Arabidopsis thaliana* desafiadas com *Botrytis cinerea*. Entretanto, o efeito sistêmico dependeu do tempo de exposição da planta ao elicitor.

Ainda em *A. thaliana* também foi estudada a aplicação de lipooligossacarídeos e peptídeoglucanos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e diversas respostas de defesa foram alteradas, em especial, a transdução de sinais de compostos mediados pela rota do ácido salicílico, proporcionando às plantas resistência contra a própria *X. campestris* pv. *campestris* (ERBS et al., 2008; PROIETTI et al., 2014).

No presente trabalho, o EPS foi capaz de reduzir a severidade da mancha bacteriana nas folhas de tomateiro que receberam o produto. No entanto, observou-se que essa proteção manteve-se restrita ao local de aplicação do polissacarídeo, diferentemente do indutor comercial (ASM) que proporcionou proteção para as plantas tanto de forma local quanto sistêmica.

As análises realizadas para verificar o modo de ação dos produtos mostraram o quão diferente podem ser os modos de ação dos indutores de resistência. De maneira geral, as plantas que receberam o indutor comercial (ASM) apresentaram alterações expressivas em todas as atividades enzimáticas e no acúmulo de  $H_2O_2$ ; por outro lado, pôde-se observar sutis alterações nos parâmetros fisiológicos, especialmente aos parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila *a*. A utilização do EPS de *L. plantarum* também desencadeou alterações nas atividades enzimáticas, porém de forma mais tardia, enquanto que nos parâmetros fisiológicos pôde-se observar que as alterações estavam mais relacionadas ao fechamento estomático. Além disto, ficaram evidentes as alterações microscópicas em plantas que receberam o EPS, com o acúmulo de compostos celulósicos na superfície das células da epiderme das folhas, situação que não foi observada com a aplicação do ASM.

Alterações na atividade de SOD, CAT, POX e PFO estão diretamente relacionados à resistência das plantas a doenças. O aumento nas atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e POX), induzidas

pelos agentes elicitores do presente trabalho, indica fortemente que houve acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), visto que o estresse oxidativo estimula a biossíntese de componentes antioxidantes e aumenta a atividade de enzimas responsáveis pela detoxificação da célula (GILL e TUTEJA, 2010; KANG, 2008).

A SOD é uma das primeiras enzimas com atividade antioxidante a ser ativada e é responsável por transformar o superóxido, que é uma espécie ativa de oxigênio, em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Após essa catálise, o peróxido de hidrogênio é transformado em água e hidrogênio pela CAT (GILL e TUTEJA, 2010; JEBARA et al., 2005). As plantas possuem esse sistema, pois as espécies ativas de oxigênio podem provocar a morte das células vegetais, por isso, a transformação delas em moléculas atóxicas é importante. Segundo Huseynova et al. (2014), o aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e SOD evidenciam a ativação de respostas de defesa na planta e poderiam ser considerados marcadores bióticos para investigar a eficiência de elicitores.

Os aumentos da POX e da PFO também foram evidenciados, indicando a ativação dos mecanismos de defesa da planta. A POX juntamente com a CAT, além de atuarem na retirada de EROs da célula vegetal, estão envolvidos na formação de lignina, por acelerarem a oxidação de substâncias (do grupo dos fenólicos) precursoras na síntese do composto (KANG, 2008; JEBARA et al., 2005). A lignina juntamente com os compostos semelhantes a ela como, silicone, celulose e a papila, são importantes mecanismos de restrição de patógenos (MANDAL et al., 2013; MANDAL et al., 2010). As papilas, por exemplo, são aposições de substâncias que geralmente se formam na parede celular, como resposta ativa da planta ao ataque de patógenos, e são formadas por silício, diversos compostos orgânicos que fluorescem sob luz UV, e calose. Após a deposição de calose na parede celular, ocorre a lignificação (SILVA et al., 2008).

No presente trabalho, apesar do EPS não alterar a atividade da POX, foi observado o acúmulo de compostos celulósicos com autofluorescência na superfície das células da epiderme das folhas tratadas com EPS, sugerindo que outras rotas devem ter sido ativadas para a formação dos mesmos. O acúmulo desses compostos na epiderme vegetal provavelmente contribuiu para a redução da severidade da mancha bacteriana visto que, de maneira geral, além da barreira física representada por esse acúmulo, os precursores de lignina podem apresentar substâncias tóxicas aos patógenos como coniferol (HAMMERSCHMIDT e KUC, 1982).

A enzima PFO, por sua vez, separada espacialmente na célula vegetal, fica localizada dentro dos tilacóides. Após o rompimento da célula, ocorre a liberação das enzimas, que ao entrarem em contato com os compostos fenólicos os oxidam, transformando-os em quinonas. As quinonas, por sua vez, são potentes compostos antimicrobianos (VAUGHN e DUKE, 1984). Mohammadi e Kazemi (2002) relacionaram a indução de resistência contra *F. graminearum* ao incremento da atividade de POX e PFO em plantas de trigo tratadas com micélios autoclavados de próprio patógeno. POX e PFO também foram determinadas como marcadoras bioquímicas para eficácia de biocontroles devido à correlação positiva do aumento da atividade das enzimas com a redução da severidade da murcha bacteriana em tomateiro tratadas com rizobactérias (SELEIM et al., 2014).

As EROs também podem ser benéficas para as plantas. O  $H_2O_2$  pode ter ação antimicrobiana direta ou ainda pode atuar como sinalizador e ajudar na ativação de mecanismos de defesa, juntamente com o ácido salicílico, possibilitando que as plantas tenham tolerância a diversos estresses abióticos e bióticos (QUAN et al., 2008). No presente trabalho, os produtos utilizados proporcionaram um aumento no acúmulo de  $H_2O_2$  nas células estomáticas (células guardas e ostíolo) mesmo antes da inoculação do patógeno. Dessa forma, podemos inferir que o EPS e o ASM podem ter desencadeado a síntese de importantes compostos antimicrobianos em um local estratégico, visto que os estômatos são as principais portas de entrada das fitobactérias (GUDESBLAT et al., 2008; MELOTTO, et al., 2006), e ainda esses compostos podem ter atuado como sinalizadores para a ativação das demais enzimas.

Por outro lado, o  $H_2O_2$  atua como regulador-chave em uma ampla gama de processos fisiológicos como senescência, fotorrespiração e fotossíntese, movimento estomático, ciclo celular, crescimento e desenvolvimento (GILL e TUTEJA, 2010). No presente trabalho, a indução desta EROs nas células estomáticas pode ter contribuído para as alterações fisiológicas nas plantas inoculadas com *X. gardneri* previamente pulverizadas com EPS e ASM.

Somado ao acúmulo de  $H_2O_2$  nas células estomáticas, a redução da condutância estomática e da transpiração em plantas que receberam o EPS indica que existiu um fechamento estomático das plantas tratadas após a inoculação e isso foi essencial para a redução da severidade da bacteriose, pois a entrada principal da fitobactéria (estômatos) foi induzida a permanecer fechada. Melotto et al. (2006) e Grimmer et al. (2012) observaram a importância dos estômatos referente à imunidade

inata da planta e constataram que a manutenção do fechamento estomatal está diretamente relacionado à defesa contra o ataque de bactérias, e conseqüentemente à redução de doenças.

Plantas tratadas com ASM apresentaram alterações fisiológicas mais relacionadas com a fluorescência da clorofila *a*, que apesar de sutis podem indicar que a ativação de defesas pelo indutor comercial demandou síntese de novas proteínas e/ou enzimas específicas para o processo, fazendo com que a planta deixe de investir em crescimento para investir em defesa. Logemann et al. (1995) e Suzuki et al. (2006) constataram que em cultura de fumo e salsa, as mudanças no metabolismo devido à utilização de indutores acarretaram em redução de crescimento das plantas, e provavelmente isso ocorreu por conta das células deixarem de expressar proteínas relacionadas à multiplicação celular para investir em proteínas relacionadas à defesa.

Em muitos estudos ecofisiológicos a diminuição de Fv/Fm indica que as plantas estão expostas a algum estresse induzido, seja ele biótico ou abiótico (BAKER, 2008). Nesse sentido, a redução da máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II das plantas tratadas com ASM seguidas da inoculação indica que houve uma redução da fração dos centros de reação do PSII, causando baixa nas reações fotoquímicas (BAKER e OXBOROUGH, 2004). Mesmo que essas alterações ainda se apresentem pouco expressivas por terem sido tomadas nos primeiros dias após a inoculação, estudos apontam que a combinação de redução da atividade fotossintética, a qual está relacionada ao crescimento da planta, associada ao aumento da respiração e redução do rendimento fotoquímico, provavelmente resultará em uma redução no crescimento nas plantas (GAYLER et al., 2004; LOGEMANN et al., 1995).

Diversos trabalhos demonstram que a ativação dos mecanismos de defesa com a aplicação do ASM gera um custo energético para as plantas, resultando em redução de crescimento e de produtividade, em experimentos a campo e em casa de vegetação (CSINOS et al., 2001; PRATS et al., 2002; WALTERS et al., 2013). Nesse sentido, plantas tratadas com EPS, apesar de apresentarem menor nível de controle da mancha bacteriana, tiveram o metabolismo enzimático alterado apenas após o desafio bacteriano, evidenciando o efeito priming do elicitador, e que dessa forma, os recursos foram alocados à resistência somente quando necessários (BECKERS e CONRATH, 2007; CONRATH et al., 2002; CONRATH, 2011). Além do mais, fisiologicamente, o EPS atuou estimulando uma barreira física contra o agente patogênico e não influenciou negativamente no rendimento fotoquímico após a inoculação, chegando até mesmo a elevar os valores do parâmetro em



questão em plantas não inoculadas, sugerindo que a indução de mecanismos de defesa realizada pelo EPS pouco compromete a demanda energética da planta. Assim, a aplicação de EPS de *L. plantarum* promoveu alterações enzimáticas, fisiológicas e histoquímicas, ou seja, várias frentes de resposta de defesa da planta foram ativadas, desde barreiras que dificultaram a entrada da *X. gardneri* para o interior das células, como respostas bioquímicas específicas, o que explicaria a redução na severidade da bacteriose em plantas pulverizadas com o polissacarídeo.

Dessa forma, vislumbra-se, dentro de uma estratégia de manejo integrado, que algumas pulverizações foliares de EPS alternadas com as do indutor comercial (ASM) em áreas com histórico da doença poderiam proporcionar redução da severidade da bacteriose sem comprometer o desenvolvimento das plantas de tomate. No caso do EPS, existe ainda a possibilidade de utilização do exopolissacarídeo na agricultura orgânica, onde o produtor conta com poucas opções para o controle de doenças.

### 3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, E R et al. *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143(3), p. 543–548, 2015.

AUSUBEL, F M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nat Immunol**, v. 6(10), p. 973–979, 2005.

BARROS, F C et al. Induction of resistance in plants against phytopathogens, **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BAKER, B. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Boca Raton, v.59, p.89-113, 2008.

BAKER, NR; OXBOROUGH, K. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. Berlin: Springer. 2004.

BECKERS, GJ; CONRATH, U. Priming for stress resistance: from the lab to the field. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10(4), p. 425–431, 2007.

BOUZON, Z L; SCHMIDT, E C. Microscopia Vegetal. In: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro; Herculano Salviano dos Reis Filho; Sonia Regina Grötzner. (Org.). *Técnicas e Métodos para Utilização Prática de Microscopia*. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Santos/Editora Guanabara Koogan, 2011, v. 1, p. 383-399.

BRADFORD, MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72(1-2), p. 248–254, 1976.

CAMELINI, CM et al. Nanofiltration of polysaccharides from *Agaricus subrufescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97(23), p. 9993–10002, 2013.

CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16(10), p. 524–531, 2011.

CONRATH, U; PIETERSE, C M J; MAUCH-MANI, B. Priming in plant – pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v. 7(5), p. 210–216, 2002.

CSINOS, AS et al. Management of Tomato spotted wilt virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid. **Plant Disease**, v. 85(3), p. 292–296, 2001.

DAS, D; GOYAL, A. Characterization and biocompatibility of glucan: A safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94(4), p. 683–690, 2014.

DUANGMAL, K; APENTEN, RKO. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry** 64: 351-359, 1999.

ERBS, G et al. Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: structure and activity. **Chemistry and Biology**, v. 15(5), p. 438–448, 2008.

GAYLER, S et al. Modelling the effect of environmental factors on the “trade-off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees - Structure and Function**, v.18(3), p. 363–371, 2004.

GIANNOPOLITIS, CN; RIES, S K. Superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 44, p. 147–159, 1975.

GILL, SS; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48(12), p. 909–930, 2010.

GRIMMER, MK; FOULKES, MJ; PAVELEY, ND. Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. **Journal of Experimental Botany**, v. 63(2), p. 695–709, 2012.

GUDESLAT, GE; TORRES, PS; VOJNOV, AA. *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. **Plant Physiology**, v. 149(2), p. 1017–1027, 2008.

HAEL-CONRAD, V et al. The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 241, p. 120–127, 2015.

HAMMERSCHMIDT, R; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, v. 20(1), p. 61–71, 1982.

HAMMERSCHMIDT, R; NUCKLES, EM; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20(1), p. 73–82, 1982.

HE, P; SHAN, L; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular Microbiology**, v. 9(6), p. 1385–1396, 2007.

HENRIQUES, FS. Leaf chlorophyll fluorescence: Background and fundamentals for plant biologists. **Botanical Review**, v. 75(3), p. 249–270, 2009.

HUSEYNOVA, IM; SULTANOVA, NF; ALIYEV, JA.. Histochemical visualization of ROS and antioxidant response to viral infections of vegetable crops grown in Azerbaijan. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 81, p. 26–35, 2014.

JEBARA, S et al. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 162(8), p. 929–936, 2005.

JONES, JDG; DANGL, JL. The plant immune system. **Nature Reviews**, v. 444, p. 323–329, 2006.

KANG, NJ. Inhibition of powdery mildew development and activation of antioxidant enzymes by induction of oxidative stress with foliar application of a mixture of riboflavin and methionine in cucumber. **Scientia Horticulturae**, v. 118(3), p. 181–188, 2008.

KRAUSE, GH; WEIS, A. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology**. v.42, p. 313–349. 1991.

LEE, S et al. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, v. 121(1), p. 147–52, 1999.

LEEMHUIS, H et al. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. **Journal of Biotechnology**, v. 163(2), p. 250–272, 2013.

LOGEMANN, E et al. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. **The Plant Journal**, v. 8, p. 865-878, 1995.

LOUWS, FJ; WILSON, M. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v. 85(5), p. 481–488, 2001.

LUIZ, C et al. Polysaccharides from aloe barbadensis reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94(2), p. 387–393, 2012.

LUIZ, C; ROCHA NETO, AC; DI PIERO, R M. Resistance to xanthomonas gardneri in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. **Journal of Plant Pathology**, v. 97(1), p. 119–127, 2015.

MANDAL, S et al. Elicitor-induced defense responses in solanum lycopersicum against Ralstonia solanacearum. **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2013.

MANDAL, SM; CHAKRABORTY, D; DEY, S. Phenolic acids act as signalling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling & Behaviour**, v. 5(4), p. 359–368, 2010.

MELLO, SCM; TAKATSU, A; LOPES, CA. Escala diagramática para avaliação da mancha bacteriana do tomateiro. **Brazilian Phytopathology**, v. 22, p. 447-448, 1997.

MELOTTO, M et al . Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v. 126(5), p. 969–980, 2006.

MOHAMMADI, M; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162(4), p. 491–498, 2002.

NOTARARIGO, S et al. Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 93(1), p. 57–64, 2013.

OBRADOVIC, A et al. Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, v. 89(7), p. 712–716, 2005. 103

PATEL, S; MAJUMDER, A; GOYAL, A. Potentials of exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52(1), p. 3–12, 2012.

PEIXOTO, PHP et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11(3), p. 137–143, 1999.

PRATS, E; RUBIALES, D; JORRÍN, J. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia helianthi*) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60(3), p. 155–162, 2002.

PROIETTI, S et al. *Xanthomonas campestris* lipooligosaccharides trigger innate immunity and oxidative burst in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 85, p. 51–62, 2014.

QUAN, LJ et al. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50(1), p. 2–18, 2008.

REZENDE, RM et al. Resistencia de progênies de *Coffea arabica* em área infestada por *Meloidogyne exigua*. **Nematropica**, Hope, v. 43, n. 2, p. 233-240, 2013.

SCHMIDT, EC et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. 40(8), p. 860–869, 2009.

SELEIM, M A et al. peroxidase and polyphenoloxidase activities as biochemical markers for biocontrol efficacy in the control of tomato bacteria. **Journal of Plant Physiology and Pathology**, v. 1, p. 8–11, 2014.

SEO, B et al. Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy, **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 49(4), p. 282-292, 2015.

SILVA, CMMS; FAY, EF. **Impacto ambiental do fungicida metalaxil**. 96 p. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

SILVA, R et al. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 49 p.

SILVA, VA et al. Uso de características fisiológicas na identificação de genótipos de café arábica tolerantes ao *Meloidogyne paranaensis*. **Coffee Science**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 242 – 250, 2015.

STANGARLIN, JR et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10(1), p. 18–46, 2011.

SUZUKI, K et al. Elicitor-induced down-regulation of cell cycle-related genes in tobacco cells. **Plant, Cell and Environment**, v. 29(2), p. 183–191, 2006.

THORDAL-CHRISTENSEN, H et al. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v.11, p. 1187-1194, 1997.

VAN LOON, L. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753–765, 1997.

VAUGHN, KC; DUKE, S O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 60, p. 106–112, 1984.

WALTERS, DR; RATSEP, J; HAVIS, ND. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64(5), p. 1263–1280, 2013.

WELMAN, AD; MADDOX, I S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 21(6), p. 269–274, 2003.

WITTSTOCK, U; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5(4), p. 300–307, 2002.

ZHANG, J; ZHOU, J M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Molecular Plant**, v. 3(5), p. 783–793, 2010.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ativação dos mecanismos de defesa da planta, elicitada a partir de produtos naturais, pode ser considerada uma forma alternativa ao uso de agroquímicos para o controle de fitopatógenos, auxiliando no controle de doenças em diversas culturas de importância agrônômica.

Os resultados obtidos na presente tese permitiram concluir que a aplicação de EPS de *L. plantarum* é capaz de alterar o metabolismo de defesa em plantas de tomateiro (Tabela 14). O maior controle da mancha bacteriana se deu com a aplicação do EPS na concentração de  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , quando aplicado 3 dias antes da inoculação do agente causal da mancha bacteriana. Foi possível observar que a proteção contra a mancha bacteriana do tomateiro ocorreu exclusivamente nas folhas que receberam o EPS, ou seja, o produto oferece uma proteção local. Nas análises para verificar alterações nos metabolismos bioquímicos pode-se observar que a aplicação do EPS pré-condicionou as plantas, induzindo acúmulos de fenólicos, alterações em enzimas relacionadas á defesa como a FAL, PFO e LOX, e enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GR, que reforçam a hipótese de que mais de uma rota metabólica foi ativada. O acúmulo de compostos precursores de calose na epiderme das folhas das plantas que receberam o biopolímero, também indicam que o produto altera o metabolismo da planta diferentemente do indutor comercial. Além do mais, o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células estomáticas apontam uma reposta de defesa fisiológicas e juntamente com fechamento estomático, deixaram evidente que a aplicação do EPS induz respostas em locais estratégicos, e isso pouco influenciou no rendimento fotossintético do fotossistema II.

Levando em conta a facilidade de crescimento do *L. plantarum* somado à rápida obtenção do biopolímero via bioprocessos, acredita-se que, dentro de uma estratégia de manejo integrado, aplicações foliares com EPS alternadas com as do indutor comercial (ASM) poderiam proporcionar redução da severidade da bacteriose sem comprometer o desenvolvimento das plantas de tomate. A pulverização do EPS também poderia ajudar no controle da bacteriose em cultivos orgânicos, visto que na agricultura orgânica há poucas opções para o controle de doenças.

**Tabela 14** - Esquema geral dos efeitos da aplicação de EPS de *Lactocabillus plantarum* e ASM (Acibenzolar-S-Metil) sobre compostos relacionadas á defesa vegetal e parâmetros fisiológicos do tomateiro, aos 5 ou 7 dias após aplicação dos produtos (dat), em plantas inoculadas (INOC) ou não (NI) com *Xanthomonas gardneri*.

	EPS				ASM			
	5 dat		7 dat		5 dat		7 dat	
	NI	INOC	NI	INOC	NI	INOC	NI	INOC
<b>FAL</b>	↓	-	-	↑	↓	↑	-	-
<b>Ácido ascórbico</b>	-	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑
<b>Ácido elágico</b>	↓	↑	↓	-	↑	↑	↓	↑
<b>Glutationa redutase</b>	-	-	-	↑	-	↑	-	-
<b>Lipoxigenase</b>	-	-	↓	↑	-	↓	-	-
<b>Peroxidase</b>	-	-	-	-	-	↑	-	↑
<b>Polifenoxidase</b>			-	↑			-	↑
<b>SOD</b>	-	-	-	↑	-	-	-	↑
<b>Catalase</b>	-	-			-	↑		
<b>Taxa fotossintética</b>	-	-	-	↑	-	-	-	↑
<b>Transpiração</b>	↑	↓	-	-	-	-	-	-
<b>Condutância estomática</b>	↑	↓	-	-	-	-	-	↑
<b>Rendimento fotoquímico</b>	-	-	-	-	-	-	↓	↓
<b>Fluorescência mínima</b>	-	-	-	-	-	-	-	↓
<b>Fluorescência máxima</b>	↑	-	-	-	↓	↓	-	↓
<b>FV/FM</b>	↑	-	-	-	-	-	-	↓
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estômatos</b>	-	↑	-	↑	-	↑	-	↑
<b>Calose epiderme</b>	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-

↑ e ↓ corresponde ao aumento ou diminuição do composto/parâmetro, respectivamente. – não observado alteração no composto/parâmetro no período analisado.

**Anexo A** – Escala diagramática para avaliação da porcentagem da área foliar infectada por *Xanthomonas* spp. em tomateiro, em condições de campo descrita por Mello et al., (1997).

