



**JOSINEIDE RODRIGUES DA COSTA**

**FOSFITOS E SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA  
CAFEEIRA NAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E  
MOLECULARES DE DEFESA DO TOMATEIRO  
À MANCHA-BACTERIANA**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**JOSINEIDE RODRIGUES DA COSTA**

**FOSFITOS E SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA CAFEEIRA NAS  
RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DE DEFESA DO  
TOMATEIRO À MANCHA-BACTERIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Costa, Josineide Rodrigues da.

Fosfitos e subprodutos da indústria cafeeira nas respostas bioquímicas e moleculares de defesa do tomateiro à mancha bacteriana / Josineide Rodrigues da Costa. – Lavras : UFLA, 2014.  
100 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.  
Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.  
Bibliografia.

1. *Xanthomonas perforans*. 2. *Solanum Lycopersicum*. 3. Green Force CuCa®. 4. Fulland®. 5. Genes. 6. Enzimas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.6423

**JOSINEIDE RODRIGUES DA COSTA**

**FOSFITOS E SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA CAFEEIRA NAS  
RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DE DEFESA DO  
TOMATEIRO À MANCHA-BACTERIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de junho de 2014.

Dr. Ricardo Magela de Souza                      UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva                              UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2014**

*A Deus por permitir esse grande aprendizado, pelo cuidado com minha família e amigos, por nunca me abandonar e não me deixar desistir de minhas missões.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que amo acima de tudo, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos de alegrias e tristezas, por toda dificuldade, consolo, graça, tranquilidade e alegria. Sei que tudo foi para o meu crescimento e aprendizagem, pelo cuidado comigo e com todos que amo e por me guiar até chegar aqui.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Valnice e Lindomar, a minha tia Valderlira, minha irmã Josiane, meu irmão Jônatas, meu cunhado Elizeu e minha sobrinha Ana Clara, pelo amor incondicional, por sempre estarem ao meu lado incentivando a seguir em frente e a superar os grandes obstáculos, por nunca negarem ajuda e pelas orações. Vocês foram meus maiores incentivadores para que mais esta fase da minha vida fosse concluída, sem vocês não teria sido possível.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e confiança, por conceder o uso do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo para a realização e concretização deste trabalho.

Ao pesquisador Pedro Martins Ribeiro Júnior e a Camila Cristina Lage Andrade, que foram meus maiores companheiros durante o período de execução dos trabalhos, pelos ensinamentos, paciência, amizade em todos os momentos e por não medirem esforços em me ajudar.

Minha gratidão a minha amiga Eliane Arantes, pela força nos momentos em que mais precisei, e a seus pais, Márcia e Carlos, e ao seu filho Igor, pelo carinho, amizade, cuidado e por me receberem com tanta satisfação em seu lar.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização de toda a parte experimental desta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos funcionários, amigos, professores e estudantes do Departamento de Fitopatologia.

Aos funcionários, professores e a todos os demais colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, por me acolherem e pelos momentos vividos em sala de aula, em especial, a Vânia e a Vanessa Diniz.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Sandra Guimaraes, Kátia Pôssa, Deila Botelho, Cláudio Ogoshi, Stéfanny Martins, Dayana Botrel, Joyce Goulart, Brenda Neves, Vanessa Foresti, Manoel Júnior, Marie Laborde, Pedro Martins, Alexandre Vidal, Alexandre Ribeiro, Bruno Costa, Rosseane Vilela, Moisés de Paula, Dario Amadeu, Marcelo Rennó, Rodolfo Vitorino, Camila Carvalho, Victor Augusto, pelo carinho, amizade, agradável convivência, momentos de descontração e por me auxiliarem na execução das minhas pesquisas. A Ana Cristina e a Sandra Mathioni pela paciência e ensinamentos.

Aos professores Dr. Ricardo Magela de Souza e Dr. Luciano Vilela Paiva pela participação na banca de defesa.

Aos eternos amigos e amigas de Brasília: Alessandra Cardoso, Rayane Paula, Rayane Lima, Edivânio Araújo, Carielli Milagre, Thiago Oliveira, Aline Israel, Bruno Barreto, Helena Rodrigues, Roberta Pereira e Íris Patrícia pela força, amor, carinho e amizade sincera nos momentos que mais precisei.

Às amigas e aos amigos de república e do Mestrado, dos quais cito agradecida: Melina Raimundi, Júlia Naves, Isabela de Oliveira, Carolina Gomes, Vanessa Romão e Marília Goulart por me acolherem e pelos momentos inesquecíveis de incentivos.

Ao Leônidas Belan, pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Luciano Paiva e Fabrício por me permitirem o uso do Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA para utilizar o equipamento de PCR em tempo real.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização de mais uma etapa da minha vida.

Muito obrigada!



## RESUMO GERAL

A mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas perforans* tem causado prejuízo econômico para a cultura do tomateiro no Brasil. O uso de indutores de defesas das plantas é uma alternativa que atende aos requisitos do manejo integrado de doenças. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito de formulações de fosfitos e extratos vegetais na proteção do tomateiro à mancha-bacteriana e seus componentes de resistência, como a expressão de genes e a atividade de enzimas envolvidas no processo de defesa das plantas. Mudanças de tomateiro foram pulverizadas com Kasumin<sup>®</sup>, Kocide<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Reforce Cu<sup>®</sup>, Reforce K<sup>®</sup>, Green Fós<sup>®</sup>, Reforce Zn<sup>®</sup>, Green Force CuCa<sup>®</sup>, Green Force S<sup>®</sup>, ET 64<sup>®</sup>, Big Red<sup>®</sup>, Green Force KP<sup>®</sup> nas suas respectivas doses indicadas para campo e inoculadas quatro dias depois com *Xanthomonas perforans*. O efeito tóxico direto dos produtos *in vitro*, foi testado nas mesmas concentrações utilizadas no experimento *in vivo*, além de 50 e 25% das doses de cada produto utilizado. Os produtos foram adicionados ao meio de cultura Kado 523 e após a solidificação dos meios, foram inseridos 10 µL de suspensão bacteriana, sendo verificado o efeito tóxico pela inibição do crescimento da bactéria. Para a avaliação dos componentes de defesa da planta, foram determinadas as atividades das enzimas peroxidases (POX), catalases (CAT), ascorbato peroxidases (APX), superóxido dismutases (SOD) e fenilalanina amônia-liases (PAL). Realizou-se também a análise do efeito do Fulland<sup>®</sup> e do Green Force CuCa<sup>®</sup> sobre o perfil da expressão gênica dos genes CAT, SOD, PAL e POX. Os tratamentos Green Force CuCa<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup> e Reforce Zn<sup>®</sup> proporcionaram a maior proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana. Com relação ao experimento *in vitro*, *Xanthomonas perforans* demonstrou resistência ao antibiótico casugamicina em todas as concentrações testadas e sensibilidade aos produtos com formulações à base de nutrientes, de subprodutos da indústria cafeeira, hidróxido de cobre e estreptomina. Observou-se também que os produtos Green Force CuCa<sup>®</sup> e Fulland<sup>®</sup> induziram as respostas de defesa das plantas de tomateiro contra mancha-bacteriana, pois a atividade das enzimas POX, CAT, APX foi maior antes e após a inoculação. Já a enzima superóxido dismutase teve sua atividade aumentada somente após a inoculação. A atividade da PAL não foi aumentada nas plantas de tomateiro em momento algum. Esses resultados demonstraram o efeito aditivo da expressão gênica dos genes que codificam para as enzimas da CAT, SOD, PAL e POX, na presença de indutores Green Force CuCa<sup>®</sup> e Fulland<sup>®</sup> e inoculados com a fitobactéria em mudas de tomateiro.

Palavras-chave: *Xanthomonas perforans*. *Solanum Lycopersicum*. Respostas de defesa. Green Force CuCa<sup>®</sup>. Fulland<sup>®</sup>. Genes. Enzimas.

## GENERAL ABSTRACT

The bacterial spot caused by *Xanthomonas perforans* has caused economic loss for tomato culture in Brazil. The use of plant defense inducers is an alternative that meets the requisites of the integrated disease management. In this work, we aimed at evaluating the effect of phosphite formulations and plant extracts, in the production of tomato, over the bacterial spot and its resistance components, such as gene expression and the activity of enzymes involved in the plant defense process. Tomato seedlings were pulverized with Kasumin<sup>®</sup>, Kocide<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Reforce Cu<sup>®</sup>, Reforce K<sup>®</sup>, Green Fós<sup>®</sup>, Reforce Zn<sup>®</sup>, Green Force CuCa<sup>®</sup>, Green Force S<sup>®</sup>, ET 64<sup>®</sup>, Big Red<sup>®</sup> and Green Force KP<sup>®</sup> in their respective doses indicated for field and inoculated for days later with *Xanthomonas perforans*. The direct toxic effect of the products *in vitro* was tested with the same concentrations used in the *in vivo* experiment, in addition to 50 and 25% of the doses applied of each product used. The products were added to the Kado 523 culture medium and, after the solidification of the medium, 10 µM of the bacterial suspension were transferred, verifying the toxic effect by inhibiting bacterial growth. For the evaluation of the plant defense components, the activity of enzymes peroxidase (POX), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was determined. The analyses of the effects of the Fulland<sup>®</sup> and of the Green Force CuCa<sup>®</sup> over the genic expression profile of genes CAT, SOD, PAL and POX were performed. The Green Force CuCa<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup> and Reforce Zn<sup>®</sup> provided higher protection to the tomato plant against bacterial spot. Regarding the *in vitro* experiment, *Xanthomonas perforans* demonstrated resistance to the kasugamycin antibiotic in all tested concentrations and sensibility to the products with nutrient, coffee industry byproduct, copper hydroxide and streptomycin-based formulations. We also observed that the Green Force CuCa<sup>®</sup> and Fulland<sup>®</sup> products induced defense response against bacterial spot from the tomato plants, because the activity of enzymes POX, CAT and APX was higher after inoculation. The superoxide dismutase enzyme had its activity increased only after inoculation. The activity of the PAL was not increased in tomato plants at any time. These results show the additive effect of the genic expression of the genes that coded for the Cat, SOD, PAL and POX enzymes in the presence of the Green Force CuCa<sup>®</sup> and Fulland<sup>®</sup> inducers and inoculated with the phyto-bacteria in tomato seedlings.

Keywords: *Xanthomonas perforans*. *Solanum lycopersicum*. Defense responses. Green Force CuCa<sup>®</sup>. Fulland<sup>®</sup>. Genes. Enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Efeito tóxico de formulações à base de nutrientes, de subprodutos da indústria cafeeira e cúpricos no crescimento de *Xanthomonas perforans* comparados com o antibiótico sulfato de estreptomicina e água ..... 52

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 Amplificação das bandas a partir do *pool* das amostras das três repetições biológicas, por meio da RT-PCR. N: controle negativo (Água + *primer*), M: marcador de peso molecular 100 pb Ladder (Invitrogen) ..... 72
- Figura 2 Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR dos genes *Catalase* (CAT) (a) e *Fenilalanina amônia-liase* (PAL) (b) aos 1,2, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após a pulverização dos tratamentos (dap). A inoculação da bactéria *Xanthomonas perforans* ocorreu aos 4 dap. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene Alfa tubulina ..... 75
- Figura 3 Perfil da expressão quantitativa relativa por qRT-PCR dos genes *Peroxidase* (POX) (a) e *Superóxido dismutase* (SOD) (b) aos 1,2, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após a pulverização dos tratamentos (dap). A inoculação da bactéria *Xanthomonas perforans* ocorreu aos 4 dap. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene Alfa tubulina ..... 77

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Formulações, doses e fabricantes dos produtos utilizados na proteção de tomateiro contra *Xanthomonas perforans* .....44
- Tabela 2 Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha-bacteriana (AACPSD) do tomateiro .....49
- Tabela 3 Efeito de diferentes doses de produtos alternativos na toxidez direta a *Xanthomonas perforans* .....51

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Sequência dos *primers* utilizados para análise de RT-PCR .....66

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução Geral .....	14
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Importância da cultura do tomateiro</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>A mancha-bacteriana</b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Indução de resistência de plantas a patógenos</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Respostas de defesa de plantas induzidas por formulações de fosfitos e extratos vegetais</b> .....	23
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>CAPÍTULO 2</b> Produtos alternativos na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana .....	38
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>2.1</b>	<b>Obtenção dos isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> e inoculação</b> .....	42
<b>2.2</b>	<b>Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana</b> .....	43
<b>2.3</b>	<b>Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira no crescimento de <i>Xanthomonas perforans in vitro</i></b> .....	46
<b>3</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>3.1</b>	<b>Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana</b> .....	48
<b>3.2</b>	<b>Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira no crescimento de <i>Xanthomonas perforans in vitro</i></b> .....	51
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
	<b>CAPÍTULO 3</b> Produtos alternativos na resposta de defesa induzida do tomateiro contra mancha-bacteriana .....	60
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	62
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	64
<b>2.1</b>	<b>Produtos alternativos na resposta de defesa induzida do tomateiro contra mancha-bacteriana</b> .....	64
<b>2.2</b>	<b>Desenho dos <i>primers</i> para RT-qPCR</b> .....	65
<b>2.3</b>	<b>Extração de RNA de tomateiro e síntese de cDNA</b> .....	66
<b>2.4</b>	<b>Síntese de cDNA e análise dos <i>primers</i> por RT-PCR</b> .....	67
<b>2.5</b>	<b>Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)</b> .....	67

<b>2.6</b>	<b>Análises bioquímicas .....</b>	<b>68</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Determinação da atividade de guaiacol peroxidases, fenilalanina amônia-liases e das proteínas totais .....</b>	<b>68</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Determinação da atividade da ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase .....</b>	<b>70</b>
<b>2.7</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>71</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>3.1</b>	<b>Análise da expressão de genes de defesa por RT-PCR.....</b>	<b>72</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise da expressão de genes de defesa por RT-qPCR.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3</b>	<b>Determinação da atividade das enzimas peroxidases, catalases, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e fenilalanina amônia-liases .....</b>	<b>80</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>

## CAPÍTULO 1 Introdução Geral

### 1 INTRODUÇÃO

As espécies de bactéria *Xanthomonas perforans*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. gardneri* são causadoras da mancha-bacteriana (JONES et al., 2004), uma das principais doenças do tomateiro, não somente no Brasil, mas também em todas as regiões produtoras no mundo. Quezado-Soares et al. (1998) relataram, em condições experimentais de campo, que esse complexo bacteriano pode causar perdas de até 52% na produção.

O principal método de controle da mancha bacteriana é o químico, com a utilização de produtos cúpricos e antibióticos, que, muitas vezes, não apresentam boa eficácia para o manejo de doenças bacterianas, devido à resistência destas bactérias a antibióticos e produtos a base de cobre. A baixa eficiência desses produtos a doenças bacterianas tem estimulado esforços para desenvolver estratégias alternativas de manejo de doenças causadas por este tipo de patógeno na cultura do tomateiro (GORE; O'GARRO, 1999). Dentre as estratégias mais estudadas, destaca-se a indução de resistência, que é caracterizada pela ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta em resposta a eliciadores abióticos e bióticos, apresentando baixa toxidez ao homem e ao ambiente (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Dentre os princípios ativos registrados no Brasil para o controle da mancha-bacteriana do tomateiro, está o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM), conhecido comercialmente como Bion<sup>®</sup> (BRASIL, 2014). Produtos à base de nutrientes, como formulações de fosfitos, vem ganhando destaque no manejo de doenças em plantas, cujo modo de ação pode ocorrer pela ativação do sistema de defesa natural das plantas e pela toxidez direta sobre os patógenos (JACKSON et al., 2000; NOJOSA et al., 2009). Formulações à base

de extratos vegetais também têm despertado o interesse dos pesquisadores, pois são capazes de atuar como indutores de resistência em plantas contra patógenos (TOYOTA, 2008).

Os indutores de resistência atuam como moléculas que estimulam as respostas de defesa da planta, fazendo com que as células das plantas reconheçam e percebam esses estímulos, ocorrendo a transdução de sinais dentro da célula, ativação de mensageiros secundários, fatores de transcrição e expressão de genes de defesa específicos que codificam a síntese de compostos de resistência, que impedem ou dificultam o desenvolvimento do patógeno (LEITE et al., 1997; MÉTRAUX, 2001; SCHENK et al., 2000).

Dessa forma, teve-se como objetivos neste trabalho: avaliar o efeito de formulações de fosfito e de formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana e avaliar o efeito destas formulações na toxidez direta sob *Xanthomonas perforans* e na indução de respostas de defesa bioquímicas e moleculares em tomateiro contra *X. perforans*.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) tem como centro primário de origem um território limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo Chile, a oeste pelo Oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes. Antes da colonização espanhola, o tomateiro foi levado para o México (centro secundário), onde passou a ser cultivado e melhorado. No Brasil, foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX (FILGUEIRA, 2003, 2008).

O tomateiro pertence à família botânica das Solanáceas e é uma olerícola cultivada no mundo inteiro, sendo a segunda olerícola mais produzida no Brasil, superada apenas pela cultura da batata (ALVES; FERNANDES; MARIN, 2008; CANÇADO JÚNIOR et al., 2003).

O fruto do tomateiro é amplamente utilizado na culinária em diversos países (ALVES; FERNANDES; MARIN, 2008). É uma cultura anual, herbácea de porte arbustivo, podendo desenvolver-se em dois tipos de segmentos, o de mesa e o industrial. Os destinados ao consumo *in natura* ou de mesa têm crescimento indeterminado, podendo chegar a 10 m em um ano, necessitando de tratos culturais como estaqueamento e tutoramento. Em geral, os destinados ao processamento industrial têm crescimento limitado, porte rasteiro e são utilizados para preparos de extratos, sucos e polpas (ALVARENGA, 2004).

No Brasil, a cadeia produtiva do tomate passou por transformações na última década, principalmente, com relação à modernização e aumento da produtividade. A produção brasileira de tomate até abril de 2013 atingiu 4,2 milhões de toneladas (t), representando um acréscimo de 14,2% na produção em relação à safra de 2012 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE, 2013). O estado de Goiás destaca-se como o maior

produtor de tomate industrial, sendo a produção aproximada de 1,4 milhões de t, seguido dos estados de São Paulo e Minas Gerais que são os maiores produtores e consumidores do fruto *in natura* (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA, 2013).

Para o consumo *in natura*, o tomate apresenta elevado custo devido à demanda de mão de obra e pela grande quantidade de agrotóxicos aplicada que é justificada devido à grande incidência de doenças causadas por fungos, vírus, nematoides e bactérias sobre essa cultura (FARIA; OLIVEIRA, 2005, 2011).

Dentre esses patógenos que ocorrem na cultura do tomateiro, destacam-se as bactérias: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganenses* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium* spp., *Pseudomonas corrugata* e o complexo de *Xanthomonas* spp. (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*).

## 2.2 A mancha-bacteriana

Dentre as bacterioses do tomateiro, destaca-se a mancha-bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas* (JONES et al., 2004). É uma doença de ocorrência mundial, de importância não somente na cultura do tomateiro, mas também na cultura do pimentão (JONES; STALL, 1998). Essa importância deve-se ao fato de ser uma doença de difícil controle, devido à ausência de agrotóxicos eficientes, inexistência de cultivares resistentes e ocorrência de uma rápida disseminação na lavoura (JONES et al., 1997; LOPES; QUEZADO-SOARES, 2000).

No Brasil, a doença foi observada pela primeira vez em 1959, em plantios de tomateiro no estado de São Paulo (RODRIGUES NETO; SUGIMORI; MALAVOLTA JÚNIOR, 1984). Os sintomas da doença são observados nas folhas, frutos, flores e caules (JONES et al., 1991). Nos frutos,

os sintomas aparecem em lesões circulares amareladas de textura áspera com bordos que podem se tornar levemente elevados com centro deprimido e lesões que passam da cor amarela para marrom acinzentado (JONES et al., 1997). Nas folhas, as lesões iniciais aparecem como manchas circulares e em condições de alta umidade do ar pode ocorrer acúmulo generalizado de líquido entre os tecidos (anasarca) ou, em ataques severos, pode ocasionar coalescimento das lesões provocando amarelecimento, destruição por necrose das folhas, queda de flores e frutos em formação, comprometendo a qualidade e a produtividade tanto de tomate para indústria, quanto para consumo *in natura* (JONES et al., 1991; LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005).

A bactéria é disseminada por chuvas associadas a ventos fortes, respingos de água, irrigação por aspersão e pivô central, podendo sobreviver em sementes infectadas, restos de culturas e plantas infestantes (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010; ROMEIRO, 1995). A mesma pode penetrar na planta por meio dos estômatos ou por meio de ferimentos ocasionado pelo amarrio e desbrota (VAKILI, 1967). No Brasil, a mancha-bacteriana causa sérios danos às lavouras que produzem tomates para consumo *in natura*, porém não há relatos de estudos em campo que demonstrem quantitativamente estas perdas. Em condições experimentais, Quezado-Soares et al. (1998) relataram perdas de até 52 % causadas pela doença em tomateiro rasteiro cultivado sob irrigação por aspersão convencional. A mancha-bacteriana do tomateiro tem como condições favoráveis, alta umidade relativa do ar associada ao molhamento foliar e temperaturas entre 20 e 30°C (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005; LOPES; SANTOS 1994; MORTON, 1965).

Estudos comprovaram a existência de diversidade genética e fenotípica dentro da espécie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Jones et al. (2004) propuseram que a mancha-bacteriana pode ser causada por um complexo de quatro espécies: *Xanthomonas euvesicatoria* (grupo A), *X. vesicatoria* (grupo

B), *X. perforans* (grupo C) e *X. gardneri* (grupo D). No Brasil, atualmente prevalecem as espécies *X. perforans* e *X. gardneri*, sendo a primeira de maior predominância (ARAÚJO et al., 2011).

*Xanthomonas perforans* é a única espécie que pode apresentar diferenciação quanto a sua sintomatologia nas plantas, pois pode causar perfurações no interior da área necrosada das folhas (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Araújo et al. (2011) relataram que a virulência de cada espécie é variável de acordo com as temperaturas estudadas, 20, 25 e 30°C. *Xanthomonas perforans* mostrou-se mais agressiva sob temperaturas mais elevadas, enquanto que *X. gardneri* foi favorecida por temperaturas amenas, a *X. euvesicatoria* foi menos agressiva para todas as temperaturas avaliadas e a *X. vesicatoria* apresentou sintomas em todas as temperaturas avaliadas.

Para o manejo da mancha-bacteriana, recomenda-se a limpeza do local de semeio, utilização de variedades comerciais com algum nível de resistência ao patógeno, utilização de sementes e mudas saudáveis, rotação de cultura e controle químico por meio de produtos à base de cobre e antibióticos (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010; SILVA-LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005). Além dos cúpricos, estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup>) e cloretos de benzalcônio (Fegatex<sup>®</sup>) (BRASIL, 2014). Em condições climáticas muito propícias à doença, os produtos cúpricos, muitas vezes, não são eficientes, o que pode também estar relacionado à predominância de isolados resistentes da população bacteriana nos locais de cultivo (COSTA et al., 2012).

A agricultura sustentável enfrenta vários problemas, destacando-se o controle de doenças em plantas. A conscientização acerca dos problemas ambientais causados pelos pesticidas utilizados no controle dessas doenças tem levado a muitas pesquisas que visam à obtenção de tecnologias eficazes e

produtos pouco tóxicos à natureza, em substituição ou redução do uso destes produtos (SILVA et al., 2010). Dentre as tecnologias promissoras estudadas, destaca-se a indução de resistência em plantas, que consiste na ativação das respostas de defesa da planta contra patógenos em resposta a um eliciador biótico ou abiótico.

### **2.3 Indução de resistência de plantas a patógenos**

As plantas, quando eliciadas por patógenos, apresentam mecanismos de resistência naturais que são utilizados como barreiras para impedir a agressão causada pelos mesmos, essas barreiras são denominadas de defesas estruturais ou constitutivas. Dentre estas barreiras estão a cutícula, estômatos, tricomas, e substâncias bioquímicas pré-formadas, como os compostos fenólicos. Portanto, quando o patógeno consegue passar por essas barreiras constitutivas da planta, se reconhecido pode desencadear a formação demais uma série de mecanismos de resistência. Estes mecanismos denominados de defesas induzidas podem ser estruturais, como tiloses, camada de cortiça, lignificação, ou bioquímicos, como o acúmulo de fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A indução de resistência em plantas contra patógenos representa um método alternativo no controle de doenças, a qual ativa os mecanismos de defesa latentes na planta. A resistência induzida pode ser ativada por diversas substâncias, evitando ou atrasando a entrada do patógeno nos tecidos das plantas, por meio de mecanismos de defesa. Cavalcanti, Brunelli e Stangarlin (2005) e Resende et al. (2004) relatam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas).

A utilização dos produtos ASM e ácido salicílico induzem a resistência sistêmica em várias espécies de plantas contra uma ampla gama de patógenos, dentre eles fungos, vírus e bactérias (GÖRLACH et al., 1996; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). Em plantas de tomateiro, a aplicação de ASM reduziu em 69% a severidade da mancha-bacteriana causada por *X. vesicatoria* (MEDEIROS et al., 2009). Itako et al. (2012) relataram que plantas pulverizadas com estes produtos reduziram em 87,22% a área abaixo da curva de progresso da mancha-bacteriana causada por *X. perforans* e que essa redução pode estar correlacionada com a indução dos mecanismos bioquímicos de defesa do tomateiro. Ibrahim (2012) também observou que pulverizações de plantas de tomateiro com o ácido salicílico na concentração de 10 mM, reduziu significativamente o número de lesões em plantas inoculadas com *X. vesicatoria*.

Formulações de fosfitos também têm demonstrado ser promissoras no controle de doenças de plantas, proporcionando uma melhor qualidade das culturas, pois podem atuar na nutrição da planta, ativar a defesa natural da mesma e agir diretamente sobre o patógeno (DATNOFF; SEEBOLD; CORREA, 2001; JACKSON et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2008; NOJOSA et al., 2009). Os fosfitos são compostos provenientes da neutralização do ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ), principalmente, por uma base (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidróxido de amônio). A base mais utilizada é o hidróxido de potássio, formando o fosfito de potássio (REUVENI, 1997). Os fosfitos originaram-se do fungicida etil fosfonato (Fosetyl-Al), o qual comprovadamente induz a síntese de fitoalexinas em citros (AFEK; STZEJNBERG, 1989) e têm sido formulados como sais de manganês, cobre ou zinco, e utilizados no controle de oomicetos e de fungos causadores de podridões do colo, raiz, troncos e frutos (RESENDE et al., 2008).

Diversos trabalhos na literatura têm apresentado os fosfitos como possíveis indutores de resistência contra doenças em plantas. Em mudas de

cafeeiro, produtos contendo fosfitos foram eficazes no controle de *Phoma costarricensis*, reduzindo a severidade da mancha de Phoma, sem diferir em relação aos fungicidas tebuconazole e fosetyl-Al (NOJOSA, 2003; NOJOSA et al., 2009).

Segundo Nojosa (2003), a aplicação de fosfitos nas mudas proporcionou acúmulo de lignina e de fenóis solúveis. Ribeiro Júnior (2008) observou que pulverizações de fosfitos de potássio, manganês e zinco em cafeeiros adultos durante dois anos consecutivos (de dezembro a julho) proporcionaram, em ano de alta produção, reduções de 30% e 25%, respectivamente, na severidade da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro. Em tomateiro, a severidade da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foi reduzida em plantas pulverizadas com fosfito de potássio (NASCIMENTO et al., 2008). Em tubérculos de batata, Lobato et al. (2011) observaram que aplicações foliares de fosfito resultaram em efeito protetor contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e, além disso, a área lesionada em tubérculos foi reduzida em aproximadamente 50%.

Elicidores presentes nas formulações indutoras de resistência fazem com que ocorram respostas de defesa nas plantas, gerando alterações bioquímicas, e ativando o sistema de defesa (SOARES; MACHADO, 2007). Assim, produtos naturais como extratos de folhas ou de casca de frutos de cafeeiro também têm despertado o interesse de pesquisadores (TOYOTA, 2008). Resende et al. (2006, 2007) solicitaram o depósito de patente para formulação de produtos à base de extratos de folhas de cafeeiro e cascas de frutos de cafeeiro. Tais formulações têm como principal matéria prima folhas de cafeeiro que caem no solo (devido a doenças, colheita de frutos, podas e outros estresses) e subprodutos do beneficiamento dos grãos (endocarpo, mesocarpo e exocarpo). Estas podem ser utilizadas com ou sem espalhantes adesivos ou outros adjuvantes para o controle de doenças no cafeeiro, cacaueteiro, algodoeiro e

tomateiro (AMARAL, 2005; BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009; RESENDE et al., 2004).

Resende et al. (2004) observaram redução significativa na porcentagem da mancha de phoma de 20 e 38% em plantas de café pulverizadas com extrato de casca de café e extrato de folhas de cafeeiro infectadas ou não com ferrugem, respectivamente. Amaral (2005) observou reduções na porcentagem da Cercosporiose de 40% e 37%, respectivamente, em plantas pulverizadas com formulações à base de extrato de casca de cafeeiro e extrato de folhas de cafeeiro com ferrugem e inoculadas com *Cercospora coffeicola*. Santos et al. (2007) também relataram que plantas pulverizadas com formulações à base de extrato de folhas de cafeeiro tiveram redução na área abaixo da curva de progresso da mancha de phoma em 61% quando comparadas às plantas pulverizadas com água e, em 30%, em relação às plantas pulverizadas com o fertilizante foliar Viça-Café Plus<sup>®</sup>. Toyota (2011) avaliou o efeito da aplicação de extratos vegetais sobre a ferrugem do cafeeiro, e observou que o NEFID (extrato à base de folhas de cafeeiro) reduziu 30 a 40% a severidade da doença, quando comparados à testemunha, em pesquisas realizadas nos anos de 2009 e 2010, respectivamente. A utilização desses agentes eliciadores e ou indutores das defesas das plantas é uma alternativa que atende aos requisitos do manejo integrado de doenças devido, principalmente, ao menor impacto ambiental causado (WALTERS; FONTAINE, 2009).

#### **2.4 Respostas de defesa de plantas induzidas por formulações de fosfitos e extratos vegetais**

O reconhecimento de agentes bióticos ou abióticos é realizado por receptores específicos ou inespecíficos para que haja a posterior ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta. A transdução de sinal incide para



transmitir o sinal para dentro da célula, realizada por mensageiros secundários, proteínas G e alterações nas fosforilações de proteínas. Em seguida, ocorre então a ativação de genes envolvidos em diversas respostas de defesa da planta, tais como explosão oxidativa, reação de hipersensibilidade, síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), como  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, além de enzimas que codificam para a produção de fitoalexinas, acúmulo de lignina nos tecidos, aumento na formação de calose e fortalecimento da parede celular, levando à resistência sistêmica adquirida (SAR) e/ou à resistência sistêmica induzida (ISR) (CAMPOS; RESENDE; SILVA, 2011; GRANT; LAMB, 2006).

As espécies ativas de oxigênio (EAO) são geradas durante um estresse e são umas das primeiras respostas de defesa das plantas, ocorrendo geralmente no metabolismo celular, mas, quando em excesso, tornam-se tóxicas às células (MOLLER, 2001). A interação planta-patógeno pode ser compatível ou incompatível, ambas geram EAO. A reação de hipersensibilidade é um exemplo de interação incompatível, pois durante a resposta da planta com gene de resistência ao patógeno avirulento há a produção EAO, gerando o acúmulo dessas espécies que resulta em um colapso celular localizado. Esse processo é denominado como explosão oxidativa, na qual o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução parcial por meio de uma sucessiva adição de elétrons, gerando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila livre ( $OH^\cdot$ ) (LAMB et al., 1989; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

A presença de eliciadores aciona o sistema antioxidante enzimático, composto por catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX) que atuam, principalmente, protegendo as células e compartimentos subcelulares das EAO geradas a partir da ocorrência de estresse nas células vegetais (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; SOARES; MACHADO, 2007).

A SOD é a primeira enzima que atua como parte do sistema antioxidante das plantas, promovendo a dismutação do ânion  $O_2^-$  para  $H_2O_2$ , o qual é posteriormente detoxificado pelas enzimas CAT e APX. A APX, na primeira reação de catalisação, utiliza o ascorbato como agente redutor, gerando  $H_2O$  e monodehidroascorbato redutase (MDA) (APEL; HIRT, 2004). Vários estudos relatam a atividade da SOD em plantas expostas ao estresse biótico e abiótico (BADAWI et al., 2004; FERNÁNDEZ-OCAÑA et al., 2011; TANG et al., 2006).

As POX são proteínas relacionadas à patogênese, pertencentes à família das PR-proteínas, induzidas por ferimentos e infecção por patógenos. Têm como principal função reforçar a parede celular através dos metabolismos ligados aos processos de lignificação de células vegetais hospedeiras, oxidação de fenóis, deposição de suberina nos tecidos danificados durante a reação de defesa contra agentes externos bióticos ou abióticos (DATTA; MUTHUKRISHNAN, 1999; LOON; STRIEN, 1999). Em tomateiros, acredita-se que essa enzima esteja envolvida na última etapa de lignificação da parede celular (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Cavalcanti et al. (2006a) verificaram maior atividade da POX em plantas de tomateiros pulverizadas com ASM e inoculadas com *X. vesicatoria*. Baysal, Soyulu e Soyulu (2003) também verificaram que plantas de tomateiro pulverizadas com ASM apresentaram maior atividade da POX quando infectadas por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Outra enzima chave na defesa de plantas é a fenilalanina amônia-liase (PAL). Esta catalisa a reação de desaminação do aminoácido *L*-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, a qual é a primeira etapa envolvida na rota dos fenilpropanoides que é de grande importância para a produção de compostos fenólicos, com potencial antimicrobiano, além de compostos secundários de defesa como algumas fitoalexinas (SCHUSTER; RETEY, 1995; TSUGE et al., 2004).

Ibrahim (2012) relatou que plantas de tomateiro inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* e pulverizadas com ácido salicílico (SA) tiveram um aumento progressivo nas atividades da POX, CAT e Polifenol oxidases em comparação com plantas inoculadas com *X. vesicatoria* e pulverizadas com água, após um dia de aplicação de SA.

Entre os produtos comercializados como fertilizantes foliares, os fosfitos vêm se destacando por atuarem diretamente sobre o patógeno, além de atuarem indiretamente, induzindo respostas de defesa na planta. Mudanças de café pulvérisadas com fosfitos de potássio, de manganês e de cobre e inoculadas com *Cercospora coffeicola*, apresentaram maiores atividades das enzimas de defesa peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases e aumento no teor de fenóis solúveis totais (RIBEIRO JÚNIOR, 2008; TOYOTA, 2008).

A regulação da expressão gênica é outra forma das plantas responderem a estresses bióticos ou abióticos (ROOK; BEVAN, 2003). O DNA complementar (cDNA) sintetizado a partir da transcrição reversa do molde de um mRNA codificante combinado à amplificação de genes específicos via reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma técnica de grande importância em estudos sobre expressão gênica, pois é um método bastante preciso, rápido, sensível e específico que detecta RNA mensageiro de baixa abundância, tendo capacidade de quantificação relativa da expressão gênica em larga escala (BUSTIN, 2000; BUSTIN et al., 2005; HEIDE et al., 1996).

A PCR em tempo real realiza a quantificação dos fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação e o ponto que permite a quantificação exata e reprodutível é o denominado *Cycle Thresbold*, pois é baseado na fluorescência, representando a quantidade de produto amplificado durante cada ciclo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A quantificação do RNA mensageiro alvo pode ser normalizada por diferenças na quantidade de RNA total adicionada a cada reação, portanto para realizar essa quantificação, são utilizados genes expressos em todos os tecidos e em todas as fases de desenvolvimento do organismo a ser estudado cuja expressão não pode variar. Estes genes são denominados controles endógenos ou constitutivos, utilizados em todas as reações de PCR em tempo real (VANDESOMPELE et al., 2002). Em trabalho realizado por Guzzo, Harakava e Tsai (2009) foi observado, por meio da técnica de qRT-PCR, a expressão temporal do gene que codifica para a enzima  $\beta$ -1,3-glucanase e constataram que o aumento da expressão ocorre a partir das 12 horas e o pico máximo ocorreu às 72 horas após pulverização de ASM em plantas de cafeeiro, demonstrando o efeito do ASM na ativação dos mecanismos de defesa. Medeiros et al. (2009) demonstraram, por meio da técnica de microarranjo, que plantas de tomateiro pulverizadas com formulação NEFID (produto à base de folhas de cafeeiro) e infectadas com *Xanthomonas vesicatoria* expressaram genes relacionados à explosão oxidativa, como a glutathione S-transferase e a superóxido dismutase.

## REFERÊNCIAS

- AFEK, U.; STZEJNBERG, A. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 736-739, 1989.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Academic, 2005. 922 p.
- ALVARENGA, M. A. R. **Cultura do tomateiro**. Lavras: UFLA, 2004. 392 p.
- ALVES, S. M. F.; FERNANDES, P. M.; MARIN, J. O. B. Condições de trabalho associadas ao uso de agrotóxicos na cultura de tomate de mesa em Goiás. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1737-1742, nov./dez. 2008.
- AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAÚJO, E. R. et al. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *Xanthomonas gardneri*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 914, p. 39-42, Nov. 2011.
- BADAWI, G. H. et al. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by over expressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. **Plant Science**, Shannon, v. 166, n. 4, p. 919-928, Apr. 2004.

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, 2005.

BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 52, n. 6, p. 747-753, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 4 abr. 2014.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct. 2000.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real time RT-PCR e a perspectiva. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

CAMPOS, M. A.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, M. S. Interações moleculares planta-patógeno. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JÚNIOR, F. B. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2011. p. 355-377.

CANÇADO JÚNIOR, F. L. et al. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate para mesa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 7-18, 2003.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-338, jul./ago. 2006.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.81-124.

COSTA, J. R. et al. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. **Tropical Plant Pathology**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 149-154, mar./abr. 2012.

DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K.W.; CORREA, V. F. J. Use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-184.

DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-related proteins in plants**. Boca Raton: CRC, 1999. 304 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Árvore do conhecimento: tomate**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tomate/abertura.html>>. Acesso em: 13 jun. 2013.

FARIA, F. F.; OLIVEIRA, J. T. A. de. Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions: identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 168, n. 11, p. 1303-1308, July 2011.

FARIA, F. F.; OLIVEIRA, J. T. A. de. **Matriz de coeficientes técnicos da cultura do tomate de mesa**: base para cálculos dos custos de produção e colheita. Campinas: UNICAMP; FEAGRI, 2005. 30 p. Disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/unimac/pdfs/ATT00004.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

FERNÁNDEZ-OCAÑA, A. et al. Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions: identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. **Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 11, p. 1303-1308, July 2011.

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

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, berinjela e jiló**. Lavras: UFLA, 2003. 331 p.

GORE, J. P.; O'GARRO, L. W. Reaction of *Xanthomonas campestris* from bell pepper and tomato in barbados to chemical control agents. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 7/8, p. 397-402, 1999.

GÖRLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, n. 4, p. 629-643, Apr. 1996.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 414-420, Aug. 2006.

GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, 2009.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

IBRAHIM, Y. E. Activities of antioxidant enzymes in Salicylic acid treated tomato against *Xanthomonas vesicatoria*. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 6, n. 27, p. 5678-5682, July 2012.



INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

**Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA)**. Rio de Janeiro, 2013. 122 p. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201304.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201304.pdf)>. Acesso em: 14 jun. 2013.

ITAKO, A. T. et al. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia**, Arica, v.30, n.2, p. 85-92, 2012.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 147-154, Jan. 2000.

JONES, A. L. et al. **Compendium of tomato disease**. Saint Paul: APS, 1991. 73 p.

JONES, J. B. et al. **Compendium of tomato diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1997. 95 p.

JONES, J. B. et al. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 6, p. 755-762, Nov. 2004.

JONES, J.B.; STALL, R.E. Diversity among xanthomonads pathogenics on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 41-58, 1998.

LAMB, C. J. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v. 56, p.215-224, 1989.

LEITE, B. et al. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas: fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 235-280, 1997.

LOBATO, M. C. et al. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n. 2, p. 155-163, June 2011.

LOON, L. C. van; STRIEN, E. A. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analyses of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 85-97, Aug. 1999.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. de (Ed.). **Doenças de tomateiro**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2005. p.62-67.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas de hortaliças**. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1997.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 754-784.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1994. 61 p.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n. 1, p. 13-18, Nov. 2001.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, Sept. 2001.

MORTON, D.J. Comparison of three serological procedures for identifying *Xanthomonas vesicatoria* in pepper leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v.55, p. 421-424, 1965.

NASCIMENTO, A. R. et al. Fontes de fosfito e acibenzolar-S-metil no controle de doenças e produtividade do tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 53-59, jan./mar. 2008.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p. 369-389, 1992.

NOJOSA, G.B.A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Phoma costarricensis***. 2003. 102 p. Tese(Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

NOJOSA, G.B.A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 60-62, 2009.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.33, p.10-13, 2004.

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

QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A. **Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2010. 28 p. (Circular Técnica, 84).

QUEZADO-SOARES, A. M. et al. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 38., 1998, Petrolina. **Anais...** Petrolina: SOB, 1998. p. 266.

RESENDE, M. L. V. et al. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café.** Lavras: UFLA, 2007. BR PI n. 0705598-6, 19 abr. 2007.

RESENDE, M. L. V. et al. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro.** Lavras: UFLA, 2006. BR PI n. 0603575-2, 2 ago. 2006.

RESENDE, M. L. V. et al. (Org.). Indução de resistência na cafeicultura: perspectivas de uso. In: BLUN, L. E. B. et al. (Ed.). **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro.** Lavras: UFLA, 2008. p. 25-35.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: IJW, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 123-130, 2003.

REUVENI, M. Post-infection applications of  $K_3PO_3$ , phosphorous Acid and Dimethomorph inhibit development of Downy mildew caused by *Plasmopara viticola* on grapes. **Journal of Small Fruit & Viticulture**, Birghamton, v. 5, n. 2, p. 27-38, Oct. 1997.

RIBEIRO JÚNIOR, P.M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*.** 2008. 107 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 51, p. 13-16, 1984.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 145 p.

ROOK, F.; BEVAN, M. W. Genetic approaches to understanding sugar response pathways. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 382, p. 495-501, 2003.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, 2007.

SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11655-11660, 2000.

SCHUSTER, B.; RÉTEY, J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydrolanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.32, p. 8433-8437, Aug. 1995.

SILVA, M. B. et al. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI FILHO, A. (Coord.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2010. p. 33-54.

SILVA-LOBO, V. L.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n. 4, p. 343-349, jul./ago. 2005.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

TANG L. et al. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1380-1386, Dec. 2006.

TOYOTA, M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

TOYOTA, M. **Indutores de resistência e os eventos bioquímicos de defesa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix***. 2011. 94p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TSUGE, S. et al. Involvement of phosphoglucose isomerase in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 478-484, May 2004.

VAKILI, N. G. Importance of wounds in bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) of tomatoes in the field. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 10, p. 1099-1003, 1967.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, June 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. **The Journal of Agricultural Science**, New York, v. 147, n. 5, p. 523-535, 2009.

## CAPÍTULO 2 Produtos alternativos na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana

### RESUMO

Estudos com a resistência induzida no manejo de doenças de plantas por meio de produtos alternativos como extratos vegetais e fosfitos apresentam resultados promissores, sendo, no entanto, pouco estudado no patossistema tomateiro *Xanthomonas perforans*. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana e verificar o efeito tóxico dessas formulações em colônias de *X. perforans*. No experimento *in vivo*, foram aplicados em mudas de tomateiro, quinze dias após a semeadura, os produtos: Kasumin<sup>®</sup>, Kocide<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Reforce Cu<sup>®</sup>, Reforce K<sup>®</sup>, Green Fós<sup>®</sup>, Reforce Zn<sup>®</sup>, Green Force CuCa<sup>®</sup>, Green Force S<sup>®</sup>, ET 64<sup>®</sup>, Big Red<sup>®</sup> e Green Force KP<sup>®</sup> sendo inoculadas quatro dias após com *Xanthomonas perforans*. Foi realizada câmara úmida 24 horas antes e após a inoculação, foram utilizadas uma testemunha absoluta e uma inoculada. No experimento *in vitro*, foram testados os produtos Kocide nas dosagens de 3,0; 1,5 e 0,75 g L<sup>-1</sup>, Kasumin nas dosagens de 3,0; 1,5 e 0,75 mL L<sup>-1</sup>, Fulland nas dosagens de 3,0; 1,5 e 0,75 mL L<sup>-1</sup> e Green Force CuCa nas dosagens de 10,0; 5,0 e 2,5 mL L<sup>-1</sup>, água destilada estéril como testemunha e, como tratamento padrão, o antibiótico sulfato de estreptomicina nas dosagens de 0,2; 0,1 e 0,05 g L<sup>-1</sup>, foram adicionados ao meio de cultura Kado 523 mantido em banho-maria à temperatura de 45°C e a seguir foram vertidos em placas de petri. Após a solidificação dos meios, foram transferidos 10 µL de suspensão bacteriana e verificado o efeito tóxico a *Xanthomonas perforans* pelo não crescimento das colônias. Os tratamentos Greenphós CuCa<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup> e Reforce Zn<sup>®</sup> proporcionaram maior proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana. A *Xanthomonas perforans* demonstrou resistência *in vitro* a Kasumin<sup>®</sup> em todas as concentrações testadas. Os produtos Green Force CuCa<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Kocide<sup>®</sup> e Sulfato de Estreptomicina<sup>®</sup>, também tiveram ação direta sobre o crescimento da bactéria.

Palavras-chave: *Xanthomonas perforans*. *Solanum Lycopersicum*. Formulações à base de nutrientes. Subprodutos da indústria cafeeira.

## ABSTRACT

Studies with induced resistance in the management of plant diseases by means of alternative products such as plant extracts and phosphites present promising results being, however, little studied in tomato plant pathosystem *Xanthomonas perforans*. In this way, we aimed at evaluating the effect of nutrient and coffee industry byproduct-based formulations in the protection of the tomato plant against bacterial spot and verifying the toxic effect of these formulations in *X. perforans* colonies. In the *in vivo* experiment, the products Kasumin<sup>®</sup>, Kocide<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Reforce Cu<sup>®</sup>, Reforce K<sup>®</sup>, Green Fós<sup>®</sup>, Reforce Zn<sup>®</sup>, Green Force CuCa<sup>®</sup>, Green Force S<sup>®</sup>, ET 64<sup>®</sup>, Big Red<sup>®</sup> and Green Force KP<sup>®</sup> were applied on tomato seedlings, fifteen days after sowing, inoculated four days later with *Xanthomonas perforans*. Humid chamber was performed 24 hours before and after the inoculation, using an absolute witness and one inoculated. In the *in vitro* experiment, we tested doses of Kocide, in doses of 3.0, 1.5 and 0.75 g L<sup>-1</sup>, Kasumin, in doses of 3.0, 1.5 and 0.75 mL L<sup>-1</sup>, Fulland, in doses of 3.0, 1.5 and 0.75 mL L<sup>-1</sup> and Green Force CuCa, in doses of 10.0, 5.0 and 2.5 mL L<sup>-1</sup>, sterile distilled water as witness and, as standard treatment, the streptomycin sulfate antibiotic in the doses of 0.2, 0.1 and 0.05 g L<sup>-1</sup>, were added to the Kado 523 culture, maintained in water bath at a temperature of 45 °C and, subsequently, were poured in petri dish. After the solidification of the mediums, 10 µL of bacterial suspension were transferred and verified the toxic effects to *Xanthomonas perforans* by the non-growth of the colonies. The Green Force CuCa<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup> and Reforce Zn<sup>®</sup> treatments provided higher protection of the tomato plant against bacterial spot. The *Xanthomonas perforans* demonstrated *in vitro* resistance to Kasumin<sup>®</sup> in all tested concentrations. The products Green Force CuCa<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Kocide<sup>®</sup> and streptomycin sulfate, had direct action over bacterial growth.

Keywords: *Xanthomonas perforans*. *Solanum lycopersicum*. Nutrient-based formulations. Coffee industry byproducts.



## 1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill) é a segunda olerícola mais cultivada no Brasil, ficando atrás apenas da cultura da batata (CANÇADOJÚNIOR et al., 2003; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE 2013). Entretanto, alguns fatores contribuem para a diminuição da produção dessa cultura e as doenças causadas por fitobactérias estão entre os mais importantes (MALAVOLTA JÚNIOR; RODRIGUES NETO, 1991). Dentre as fitobactérias destaca-se a *Xanthomonas perforans*, causadora da mancha-bacteriana do tomateiro, uma doença de difícil controle (JONES et al., 2004; LOPES; QUEZADO-SOARES, 2000).

A principal forma de controle dessa bacteriose é realizada pela aplicação de cúpricos e antibióticos, porém, além de apresentar baixa eficiência, gera contaminação ambiental, humana e seleção de bactérias resistentes a esses produtos. Como alternativa ao seu uso, está a utilização de novos produtos comerciais que apresentam eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, como os indutores de resistência de plantas.

A utilização de fertilizantes comerciais como as formulações de fosfitos vem ganhando destaque no controle de algumas doenças em plantas, e vários trabalhos demonstram que fosfitos induzem a resistência de plantas contra patógenos (DATNOFF; SEEBOLD; CORREA, 2001; JACKSON et al., 2000; LOBATO et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2008; NOJOSA et al., 2009).

Outra forma de controle de doenças que tem despertado o interesse dos pesquisadores é a utilização de produtos naturais como extratos à base de subprodutos da cadeia produtiva do cafeeiro, como extratos de folhas ou de casca de frutos de café (TOYOTA, 2008).

Estudos com a resistência induzida no manejo de doenças de plantas por meio de produtos alternativos como extratos vegetais e fosfitos apresentam

resultados promissores. Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos no controle de *Xanthomonas perforans* em tomateiro pela aplicação dessas formulações, bem como o efeito destes na ativação de genes relacionados à defesa.

Dessa forma objetivou-se com a realização deste trabalho, avaliar o efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana e avaliar o efeito tóxico direto dessas formulações à *Xanthomonas perforans*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados de *Xanthomonas perforans* e inoculação

Para a realização dos experimentos, foi utilizado o isolado 2010-92 de *X. perforans* da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq) - Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF, armazenado à temperatura ambiente em tampão fosfato de potássio (0,22 g/150 mL de  $K_2HPO_4$  anidro e 0,15 g/150 mL de  $KH_2PO_4$  anidro). Esse isolado foi obtido de plantas de tomateiro infectadas na região de Paracatu, MG, em 2010.

Para o preparo da suspensão bacteriana utilizada na inoculação, a bactéria foi repicada para meio de cultura Kado 523 (KADO; HESKETT, 1970), pelo método de estrias paralelas (MARIANO; SILVEIRA, 2005) e incubada por 24 horas a 28°C. Após este período, adicionou-se água destilada estéril na placa de Petri contendo o crescimento bacteriano e, com uma espátula, as colônias foram cuidadosamente raspadas. A concentração da suspensão foi ajustada para a leitura de 0,3 em espectrofotômetro a 600 nm de absorbância, que corresponde a  $5,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. A inoculação foi realizada por meio da pulverização da suspensão nas folhas das plantas com um pulverizador manual. Para facilitar a infecção, foi realizada câmara úmida 24 horas antes e após a inoculação utilizando sacos plásticos.

## **2.2 Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana**

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas mudas de tomateiro cultivar Santa Clara, suscetível à mancha-bacteriana. Cinco sementes foram semeadas em vasos de 3 kg contendo substrato comercial Multiplant<sup>®</sup>. Após a emergência das plântulas, foi realizado desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. Quinze dias após a semeadura, foi fornecida às plantas de tomateiro 50 mL de solução nutritiva por vaso, contendo, em mg L<sup>-1</sup>, 192 de KCl, 104,42 de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150,35 de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 61 de ureia, 0,27 de NH<sub>4</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1,61 de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 6,67 de ZnSO<sub>4</sub>, 1,74 de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O e 4,10 de MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 4,08 de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O e 5,58 de EDTA dissódico. Esta solução também foi aplicada a cada sete dias durante todo o experimento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, onde a temperatura variou de 20 a 27°C, sendo irrigadas diariamente. Aos 20 dias após a semeadura, as plantas receberam pulverização com os tratamentos (Tabela 1), em torno de 25 mL de calda por planta, quatro dias antes da inoculação com *X. perforans*.

Tabela 1 Formulações, doses e fabricantes dos produtos utilizados na proteção de tomateiro contra *Xanthomonas perforans*

Tratamentos	Dose g ou mL L <sup>-1</sup>	Formulação
1. Testemunha absoluta	---	---
2. Testemunha inoculada	---	---
3. Kocide <sup>®</sup>	3,0	DuPont do Brasil S. A. (Hidróxido de Cobre 53,8%)
4. Kasumin <sup>®</sup>	3,0	Arysta Lifescience. (Antibiótico Casugamicina 2%)
5. Fulland <sup>®</sup>	3,0	SATIS IND. E COM. LTDA. (Fosfito de cobre 20% de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 1,75 Enxofre, 3,5 % Cu)
6. Reforce Cu <sup>®</sup>	3,0	AGRICHEM do Brasil. (Fosfito de potássio + cobre)
7. Reforce K <sup>®</sup>	3,0	AGRICHEM do Brasil. (Fosfito de potássio)
8. Green Fós <sup>®</sup>	3,0	AGROFITINESS Tecnologia Agrícola. (Fosfito de potássio)
9. Reforce Zn <sup>®</sup>	2,0	AGRICHEM do Brasil. (Fosfito de potássio)

“Tabela 1, conclusão”

Tratamentos	Dose g ou mL L <sup>-1</sup>	Formulação
10. Green Force CuCa <sup>®</sup>	10	AGROFITINESS Tecnologia Agrícola. (Formulação à base de subproduto da indústria cafeeira e nutrientes)
11. Green Force S <sup>®</sup>	17,54	AGROFITINESS Tecnologia Agrícola. (Formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e nutrientes)
12. ET 64 <sup>®</sup>	17,54	AGROFITINESS Tecnologia Agrícola. (Formulação à base de subproduto da indústria cafeeira)
13. Big Red <sup>®</sup>	1,64	AGRICHEM do Brasil. (Óxido cuproso 50%)
14. Green Force KP <sup>®</sup>	17,54	AGROFITINESS Tecnologia Agrícola. (Formulação à base de subproduto da indústria cafeeira e nutrientes)

A partir do surgimento dos primeiros sintomas da mancha-bacteriana, foram realizadas quatro avaliações da severidade da doença a cada dois dias, de acordo com a escala diagramática proposta por Mello, Takatsu e Lopes (1997). Foram avaliados cinco folíolos de duas folhas totalmente expandidas de cada planta. Com os dados da severidade calculou-se a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD). O experimento foi realizado em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições e parcela experimental composta por três plantas. Este experimento foi realizado duas vezes.

Os dados da AACPSD obtidos nos dois primeiros experimentos para avaliação da severidade da doença foram combinados após determinação da homogeneidade de variância pelo teste de Cochran e Bartlett (GOMEZ; GOMEZ, 1994). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 1989).

### **2.3 Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira no crescimento de *Xanthomonas perforans in vitro***

Para a avaliação do efeito tóxico direto dos produtos à *Xanthomonas perforans*, foram utilizados os produtos padrão no experimento *in vivo* (Kocide<sup>®</sup> nas doses de 3,0; 1,5 e 0,75 g L<sup>-1</sup> e Kasumin<sup>®</sup> nas doses de 3,0; 1,5 e 0,75 mL L<sup>-1</sup>) e os produtos que proporcionaram a menor AACPSD no experimento *in vivo* (Fulland<sup>®</sup> nas doses de 3,0; 1,5 e 0,75 mL L<sup>-1</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> nas doses de 10,0; 5,0 e 2,5 mL L<sup>-1</sup>), além da testemunha (água destilada estéril) e o antibiótico sulfato de estreptomicina nas doses de 0,2; 0,1 e

0,05 g L<sup>-1</sup>. Todos os tratamentos foram adicionados ao meio de cultura Kado 523, mantido em banho-maria à temperatura de 45°C, a seguir transferiu-se o meio para as placas de Petri e, após a solidificação dos mesmos, foram transferidos 10 µL de suspensão bacteriana depositada em gotas ( $5,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), obtida conforme descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 25°C em câmara de crescimento e, após 48 horas de incubação das placas, foi verificado o efeito tóxico a *Xanthomonas perforans* pelo não crescimento da mesma. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições e parcela experimental composta por uma placa cada. O experimento foi realizado duas vezes.



### **3 RESULTADO E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana**

Nos dois experimentos realizados, a severidade da mancha-bacteriana nas mudas de tomateiro apresentou aumento ao longo do tempo em todos os tratamentos avaliados, com exceção da testemunha absoluta, que não houve incidência da doença. A testemunha inoculada manteve severidade superior aos demais tratamentos em todas as avaliações.

Em ambos os experimentos, plantas pulverizadas com Green Force Cuca<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup> e Reforce Zn<sup>®</sup> apresentaram menor AACPSD, se diferindo dos demais tratamentos, inclusive dos tratamentos padrão Kasumin<sup>®</sup> e Kocide<sup>®</sup>. Os produtos Reforce Cu<sup>®</sup>, Reforce K<sup>®</sup>, Green Fós<sup>®</sup>, Green Force S<sup>®</sup>, ET 64<sup>®</sup>, Big Red<sup>®</sup> e Green Force KP<sup>®</sup> reduziram a severidade da mancha-bacteriana, porém foram semelhantes estatisticamente aos tratamentos padrão, Kasumin<sup>®</sup> e Kocide<sup>®</sup>, os quais se diferiram da testemunha inoculada. Os tratamentos Green Force Cuca<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup> e Reforce Zn<sup>®</sup> proporcionaram de 70 a 77% de controle da mancha-bacteriana em tomateiro (Tabela 2).

Tabela 2 Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha-bacteriana (AACPSD) do tomateiro

Tratamentos	Dose g ou mL L <sup>-1</sup>	AACPSD	Controle (%)
1. Testemunha absoluta	---	0.00 a	0
2. Testemunha inoculada	---	89.29 d	0,00
3. Kocide <sup>®</sup>	3,0	31.80 c	64,38
4. Kasumin <sup>®</sup>	3,0	44.63 c	50,01
5. Fulland <sup>®</sup>	3,0	26.41 b	70,42
6. Reforce Cu <sup>®</sup>	3,0	40.43 c	54,72
7. Reforce K <sup>®</sup>	3,0	37.74 c	57,73
8. Green Fós <sup>®</sup>	3,0	48.64 c	45,52
9. Reforce Zn <sup>®</sup>	2,0	26.76 b	70,03
10. Green Force CuCa <sup>®</sup>	10	20.09 b	77,50
11. Green Force S <sup>®</sup>	17,54	39.19 c	56,10
12. ET 64 <sup>®</sup>	17,54	38.25 c	57,16
13. Big Red <sup>®</sup>	1,64	50.27 c	43,70
14. Green Force KP <sup>®</sup>	17,54	51.61 c	42,19

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

No presente estudo, o produto que proporcionou menor AACPSD foi o Green Force CuCa<sup>®</sup>, o qual não diferiu do Fulland e Reforce Zn. Segundo Resende et al. (2004) e Toyota (2008), a utilização de produtos naturais como os extratos de subprodutos da cafeicultura estão sendo promissores no controle de doenças de plantas. A eficiência desses extratos no controle de doenças de plantas vem sendo confirmada através de vários trabalhos. Medeiros et al. (2009) observaram que a pulverização de extrato de folhas de cafeeiro proporcionou a redução de 65% na severidade da mancha-bacteriana do

tomateiro. Cavalcanti et al. (2006a) relataram que a pulverização foliar de tomateiro com acibenzolar-S-metil<sup>®</sup>(ASM) e Ecolife<sup>®</sup> (formulação proveniente de biomassa cítrica) proporcionaram 47,7% e 39,2% de proteção contra *X. vesicatoria*, respectivamente. Já em cafeeiro, Santos et al. (2007) observaram em testes de campo, que o tratamento com extrato de folhas de café reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha-de-phoma em 61%, comparada à testemunha.

Outros extratos vegetais também foram utilizados para o controle de doenças de plantas. Cavalcanti et al. (2006b) investigou as respostas de defesa induzidas em tomateiro contra *X. vesicatoria* por extrato aquoso de ramos de lobeira infectados com *Crinipellis pernicioso*, o qual proporcionou redução das lesões da mancha-bacteriana de 31,4%. Xavier (2011) observou que a pulverização de extratos à base de casca de maracujá e de laranja reduziram a severidade da mancha-bacteriana do tomateiro em 81%. Costa, Zambolim e Rodrigues (2007) verificaram redução de mais de 77% na infecção causada por *Hemileia vastatrix* em mudas de cafeeiro pulverizadas com extratos aquosos de folhas de café, suspensões de conídios fúngicos, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas putida*.

No presente estudo, foi observado que o fosfito de cobre (Fulland<sup>®</sup>) e fosfito de zinco (Reforce Zn<sup>®</sup>) também reduziram significativamente a AACPSD, provavelmente devido à ativação de respostas de defesa do tomateiro. Os fosfitos são absorvidos mais rapidamente pelas plantas, portanto não exigem destas muita energia e favorece a absorção de potássio, cálcio, zinco e outros nutrientes (VITTI et al., 2005). Nascimento et al. (2008) observaram que plantas de tomateiro pulverizadas com fosfito de potássio apresentaram redução na severidade da mancha-bacteriana. Em outras culturas como videira, Pereira et al. (2012) verificaram que duas formulações de fosfito de potássio reduziram a severidade do míldio em 60,5% e 57,7%. Também Pereira et al. (2010)

observaram que a aplicação de fosfitos de potássio e de cobre reduziram a severidade do míldio da videira.

### 3.2 Efeito de formulações à base de nutrientes e de subprodutos da indústria cafeeira no crescimento de *Xanthomonas perforans in vitro*

No experimento *in vitro*, foi observado que as mesmas concentrações utilizadas no experimento *in vivo* de Green Force CuCa<sup>®</sup> e de Kocide<sup>®</sup> proporcionaram toxidez direta a *X. perforans*, assim como a estreptomicina, quando comparada à testemunha, enquanto que o Fulland<sup>®</sup> e Kasumin<sup>®</sup> não tiveram efeito tóxico à bactéria em nenhuma das doses testadas (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 3 Efeito de diferentes doses de produtos alternativos na toxidez direta a *Xanthomonas perforans*

Tratamentos	Concentrações mL ou g. L <sup>-1</sup>	Crescimento Bacteriano
1. Água	3,0	+
	1,5	+
	0,75	+
2. Kasumin <sup>®</sup>	3	+
	1,5	+
	0,75	+
3. Kocide <sup>®</sup>	3	-
	1,5	+
	0,75	+
4. Fulland <sup>®</sup>	3	-
	1,5	+
	0,75	+
5. Green Force CuCa <sup>®</sup>	10	-
	5	+
	2,5	+
6. Streptomicina <sup>®</sup>	0,2	-
	0,1	+
	0,05	+

(+) Quando houve crescimento de colônias bacterianas e (-) quando não houve crescimento de colônias bacterianas.

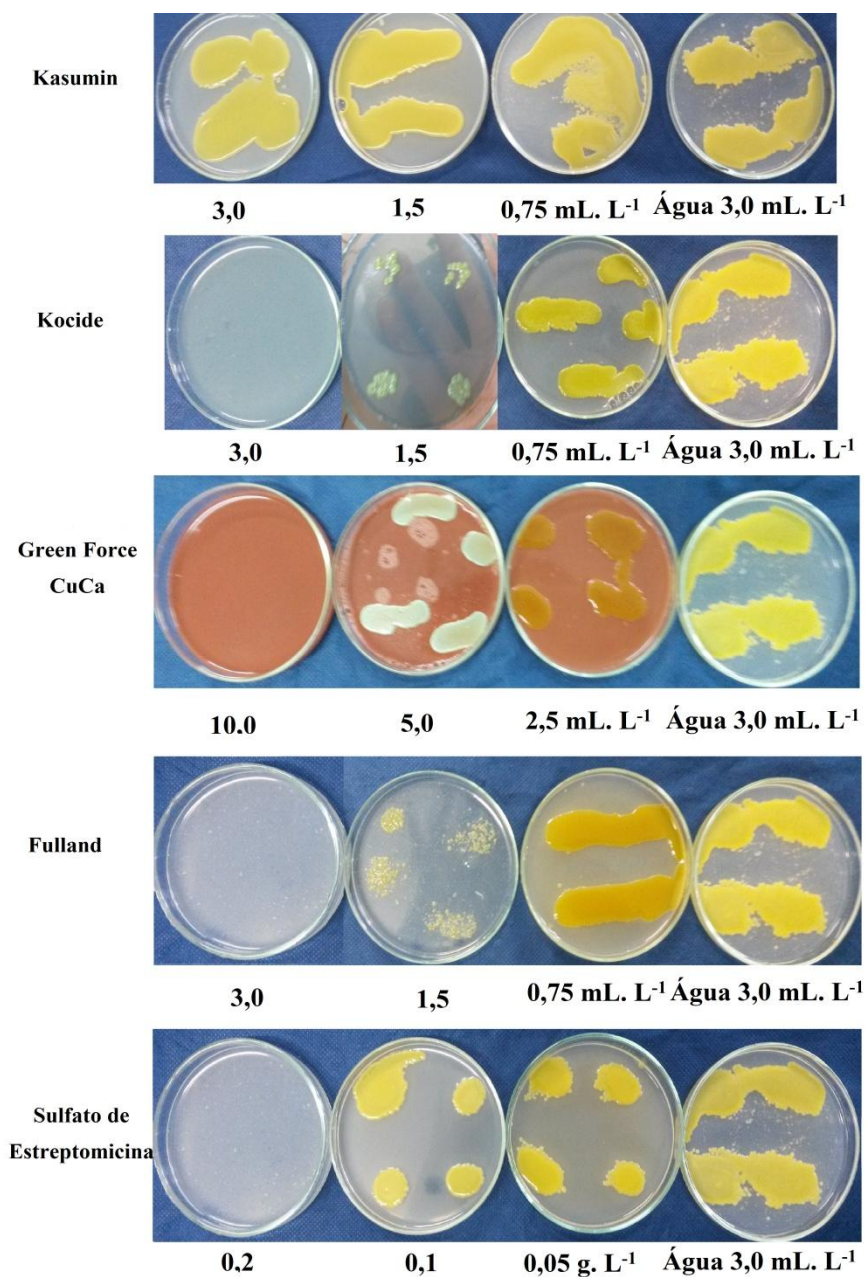


Figura 1 Efeito tóxico de formulações à base de nutrientes, de subprodutos da indústria cafeeira e cúpricos no crescimento de *Xanthomonas perforans* comparados com o antibiótico sulfato de estreptomicina e água

O fosfito de cobre Fulland<sup>®</sup>, o produto à base de subprodutos da indústria cafeeira Green Force CuCa<sup>®</sup>, o hidróxido de cobre Kocide<sup>®</sup> e o antibiótico estreptomicina (controle positivo) tiveram ação direta inibindo o crescimento da bactéria conforme as doses foram aumentadas. Os tratamentos nas doses recomendadas para campo apresentaram uma maior toxidez à bactéria. Este efeito inibitório de Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> pode ter contribuído para a proteção das plantas de tomateiro contra a mancha-bacteriana, porém além de demonstrar esse efeito tóxico direto à bactéria, esses produtos demonstram um possível efeito de indução de resistência das plantas de tomateiro, pois os produtos foram aplicados quatro dias antes da inoculação, por isso é possível dizer que houve a absorção pela planta dos princípios ativos dos produtos que agiram como moléculas eliciadoras e promoveram a ativação dos mecanismos de defesa da mesma, o que acarretou na redução da severidade da doença.

O antibiótico kasugamicina (Kasumin<sup>®</sup>) não teve efeito direto sobre essa bactéria, apresentando um crescimento semelhante ao controle (água), demonstrando uma baixa eficiência sobre esse isolado de *Xanthomonas perforans*. Em trabalho realizado por Cavalcanti et al. (2006a), o produto Ecolife<sup>®</sup> mostrou tanto efeito de indução de resistência do tomateiro inoculado com *X. vesicatoria* quanto efeito antimicrobiano. Enquanto que, em outro trabalho, Cavalcanti et al. (2006b) observaram que em ensaio *in vitro* realizado com VLA (extrato aquoso tratado termicamente a partir de tecido necrosado seco de “Lobeira” e ramos infectados com o fungo *Crinipellis perniciososa*) e ASM, estes não proporcionaram inibição do crescimento de *X. vesicatoria*. Neste trabalho, os produtos Kocide<sup>®</sup>, que é um produto à base de hidróxido de cobre, e Fulland<sup>®</sup>, fosfito de cobre, mostraram ter efeito antimicrobiano, porém, Nascimento, Fernandes e Quezado-Duval (2010) relataram em seu estudo que

fosfito de potássio em concentrações elevadas não apresentam toxidez direta a *X. perforans* e *X. gardneri*.

Corroborando com o presente trabalho, Nascimento, Fernandes e Quezado-Duval (2010) relataram que produtos à base de hidróxido de cobre só apresentaram toxidez direta a essas espécies de bactérias apenas nas concentrações mais elevadas do produto, demonstrando uma baixa sensibilidade a este princípio ativo. Esses autores também observaram que *X. perforans* é aparentemente menos sensível às moléculas estudadas, se comparadas ao isolado de *X. gardneri*. A resistência *in vitro* de *X. perforans* a produtos com princípio ativo sulfato de cobre e antibiótico estreptomicina já era esperada (STALL, 1983; STALL; THAYNER, 1962). Essa resistência *in vitro* a teores baixos de cobre, estreptomicina e oxitetraciclina foi verificada também em isolados de *Xanthomonas* spp. causadores da mancha-bacteriana do tomateiro (QUEZADO-DUVAL, 2003). E mais recentemente também foi verificado por Costa et al. (2012), a resistência *in vitro* de isolados de *X. perforans* e outras espécies como, *X. gardneri* e *X. vesicatoria* patogênicas ao tomateiro, a teores mais altos de cobre. Essa resistência a concentrações maiores de cobre podem demonstrar uma possível adaptação genética da bactéria ao produto devido à quantidade de aplicações desse princípio ativo em campo, tendo grande importância em estudos sobre a aplicação preventiva destas moléculas em campos de tomateiros para que sejam induzidos mecanismos de resistência da planta a essa bactéria.

#### 4 CONCLUSÃO

Os tratamentos Green Force Cuca<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup> e Reforce Zn<sup>®</sup> proporcionaram maior proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana quando comparados aos demais tratamentos do presente estudo.

*X. perforans* demonstrou resistência *in vitro* ao antibiótico casugamicina em todas as concentrações, já os produtos com formulação à base de fosfito, subprodutos da indústria cafeeira, hidróxido de cobre e estreptomicina, tiveram ação direta sobre essa bactéria principalmente na concentração recomendada para campo.



## REFERÊNCIAS

CANÇADO JÚNIOR, F. L. et al. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate para mesa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 7-18, 2003.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-338, jul./ago. 2006a.

CAVALCANTI, F. R. et al. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, Orlando, v. 39, n. 3, p. 408-417, Dec. 2006b.

COSTA, J. R. et al. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe, SC. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 149-154, mar./abr. 2012.

COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 150-155, mar./abr. 2007.

DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA, V. F. J. Use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 171-184.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. A. **Statistical procedures for agricultural research**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: J. Wiley, 1984. 680 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

**Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA)**. Rio de Janeiro, 2013. 122 p. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201304.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201304.pdf)>. Acesso em: 14 jun. 2013.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 147-154, Jan. 2000.

JONES, J. B. et al. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 6, p. 755-762, Nov. 2004.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

LOBATO, M. C. et al. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n. 2, p. 155-163, June 2011.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 754-784.

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; RODRIGUES NETO, J. Controle de doenças causadas por bactérias em tomateiro. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE TOMATE, 2., 1991, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 166-182.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2.ed. Recife: UFRPE, 2005. 184 p.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

MELLO, S. M. C.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p.447-448, 1997.

NASCIMENTO, A. R. et al. Fontes de fosfito e acibenzolar-S-metil no controle de doenças e produtividade do tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 53-59, jan./mar. 2008.

NASCIMENTO, A. R.; FERNADES, P. M.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Ação in vitro de produtos químicos sobre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.28, p. S1175-S1182, 2010. Suplemento.

NOJOSA, G.B.A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 60-62, 2009.

PEREIRA, V. F. et al. Fosfito de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas de uvas Merlot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 11, p. 1581-1588, nov. 2012.

PEREIRA, V. F. et al. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 25-31, jan. 2010.

QUEZADO-DUVAL, A. M. Q. **Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas á mancha bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil**. 2003. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: IJW, 2004. p. 79.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, 2007.

STALL, R. E. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1983. p. 57-60.

STALL, R.E.; THAYER, P.L. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 46, p. 389-392, 1962.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS**. Cary, 1989. Software.

TOYOTA, M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VITTI, G. C. et al. Utilização de fosfito em cana-de- açúcar. In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CANA-DE AÇUCAR, 2., 2005, Piracicaba. **Resumos...** Campinas: Intercuf, 2005. p. 17.

XAVIER, K. V. **Extratos de cascas de maracujá e de laranja na indução de resistência em cafeeiro contra a ferrugem e em tomateiro contra a mancha bacteriana**. 2011. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

### **CAPÍTULO 3 Produtos alternativos na resposta de defesa induzida do tomateiro contra mancha-bacteriana**

#### **RESUMO**

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de produtos à base de formulações de fosfito e de uma formulação à base de subprodutos da cafeicultura na atividade enzimática e na expressão de genes que codificam enzimas do processo antioxidante do tomateiro em resposta à *X. perforans*. Foram avaliados os dois tratamentos mais eficientes na proteção do tomateiro contra a mancha-bacteriana (Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup>). A atividade de enzimas relacionadas à defesa: peroxidases (POX), fenilalanina amônia-liases (PAL), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutases (SOD) foi quantificada nos tratamentos citados sendo utilizado como tratamento controle plantas pulverizadas com água destilada (testemunha absoluta) e uma testemunha inoculada, todos os ensaios foram realizados em triplicata e a concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Realizou-se também a análise do efeito do Fulland e do Green Force CuCa sobre o perfil da expressão gênica dos genes CAT, SOD, PAL e POX. Para o desenho dos *primers*, foi utilizado o *software Integrated DNA Technologies (IDT)*. Foi escolhido o gene  $\alpha$ -Tubulina como gene de referência. Para a extração do RNA total, foi utilizado o kit SV Total RNA Isolation System, protocolo para tecidos de plantas (Promega<sup>®</sup>). Para síntese de cDNA, foi utilizada uma alíquota contendo 650 ng de RNA total utilizando “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems<sup>®</sup>) Para cada gene, foram realizadas três repetições biológicas, com três repetições técnicas e também foi utilizado o controle negativo (água). Observou-se indução das respostas de defesa da planta pela aplicação dos produtos Green Force CuCa<sup>®</sup> e Fulland<sup>®</sup>, pois a atividade das enzimas peroxidases, catalases, ascorbato peroxidase foi maior depois que as plantas foram pulverizadas com os mesmos e também após a inoculação com a bactéria. Entretanto, para a enzima superóxido dismutase, a atividade só foi aumentada apenas após a inoculação. A atividade da PAL não foi aumentada em plantas de tomateiro independentemente dos produtos e da bactéria. Observou-se o efeito aditivo da expressão gênica dos genes que codificam para as enzimas da CAT, SOD, PAL e POX, na presença dos indutores Green Force CuCa<sup>®</sup> e Fulland<sup>®</sup> e também após a inoculação do patógeno em mudas de tomateiro suscetíveis à mancha-bacteriana.

Palavras-chave: Bactéria. Green Force CuCa<sup>®</sup>. Fulland<sup>®</sup>. Resistência. Defesa. Genes. Enzimas.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of phosphite-based formulation products and coffee culture byproduct-based formulations over enzyme activity and the expression of genes, which codify enzymes of the antioxidant process of the tomato plant in response to *X. perforans*. We evaluated the two treatments most efficient in the protection of the tomato plant against bacterial spot (Fulland<sup>®</sup> and Green Force CuCa<sup>®</sup>). The enzyme activity related to defense – peroxidase (POX), phenylalanine ammonium-lyase (PAL), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) – was quantified in the cited treatments, being used as control treatment plants pulverized with distilled water (absolute witness) and a inoculated witness, all trials were performed in triplicate and the protein concentration was determined according to the method described by Bradford (1976). Analysis of the effect of the Fulland<sup>®</sup> and of the Green Force CuCa<sup>®</sup> over the genic expression profile of genes CAT, SOD, PAL and POX was performed. For the design of the primers, we used the Integrated DNA Technologies (IDT) software. The gene  $\alpha$ -Tubulin was used as reference. For the extraction of total RNA, we used the SV Total RNA Isolation System kit, protocol for plant tissue (Promega<sup>®</sup>). For the cDNA synthesis, we used an aliquot containing 650 ng of total RNA using “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems<sup>®</sup>). For each gene, three biological replicates were performed, along with three technical replicates and a negative control (water). We observed induction of the plant defense responses with the application of the Fulland<sup>®</sup> and Green Force CuCa<sup>®</sup> products, since the activity of enzymes peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase was higher after the pulverization of the plants with the same and also after inoculation with the bacteria. However, for the superoxide dismutase enzyme, the activity was only increased after inoculation. The activity of the PAL was not increased in tomato plants regardless of the products and the bacteria. We observed the adding effect of the gene expression of the genes that codify for enzymes CAT, SOD, PAL and POX, in the presence of the Green Force CuCa<sup>®</sup> and Fulland<sup>®</sup> inductors as well as after the inoculation of the pathogen in tomato seedlings susceptible to bacterial spot.

Keywords: Bacteria. Green Force CuCa<sup>®</sup>. Fulland<sup>®</sup>. Resistance. Defense. Genes. Enzymes.

## 1 INTRODUÇÃO

O tomateiro é a segunda olerícola mais cultivada no Brasil, entretanto é a hortaliça que lidera em termos de produção, com aproximadamente 3,9 milhões de toneladas no ano de 2013 (CANÇADO JÚNIOR et al., 2003; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE, 2013). Entretanto esta cultura é acometida por diversas doenças, entre elas a mancha-bacteriana, causada por um complexo de bactérias do gênero *Xanthomonas* (JONES et al., 2004). Dentro desse complexo, a espécie *Xanthomonas perforans* é a de maior predominância no Brasil, sendo mais agressiva em temperaturas mais elevadas, de 25 a 30°C (ARAÚJO et al., 2011) e a única espécie que apresenta diferenciação quanto a sua sintomatologia, por causar perfurações na área necrosada (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Quezado-Soares et al. (1998) relataram que em condições experimentais de campo a mancha-bacteriana pode causar perdas de até 52% na produção, sendo a aplicação de produtos à base de cobre e antibióticos a principal forma de controle da mancha-bacteriana do tomateiro. Entretanto esta medida de controle eleva o custo de produção e, muitas vezes, não apresenta boa eficácia. Por esse motivo, a indução de resistência da planta por meio de produtos comerciais, como formulações de fosfito e extratos vegetais, pode apresentar maior eficácia e menor impacto ao ambiente (JACKSON et al., 2000; TOYOTA, 2008; WALTERS; FONTAINE, 2009).

Os indutores de resistência atuam como moléculas que podem estimular as respostas de defesa da planta por meio da ativação dos seus mecanismos de defesa. Assim as células vegetais desenvolveram um processo de sinalização para reconhecer e perceber estímulos, com posterior transdução de sinais dentro da célula, ativação de mensageiros secundários e expressão de genes de defesa (LEITE et al., 1997).

Outra forma de resposta das plantas a estresses bióticos e ou abióticos é a regulação da expressão gênica. A análise desta possibilita estudos com relação às vias metabólicas e de sinalização, as quais podem estar correlacionadas com processos celulares, sendo a regulação transcricional a melhor forma para regular essa expressão (BUSTIN et al., 2005; ROOK; BEVAN, 2003).

A explosão oxidativa é caracterizada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EAO), que quando em excesso são tóxicas às células (MOLLER, 2001). As EAO são uma das primeiras respostas de defesa da planta, que ocorre no início do processo de infecção, logo após o reconhecimento do patógeno (APOSTOL; HEINSTEIN; LOW, 1989). A presença de eliciadores e a infecção por patógenos levam a uma alteração nos eventos bioquímicos nas plantas, que ativam um sistema antioxidante enzimático, composto por catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX) (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Na literatura, existem poucos relatos sobre a atividade enzimática em plantas infectadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* em tomateiro. Os estudos existentes relacionando patógenos bacterianos com EAO envolvem, em sua maioria, bactérias da espécie de *X. vesicatoria*. Portanto, este seria o primeiro estudo a relatar alterações bioquímicas e moleculares relacionadas à resposta de defesa induzidos por fosfitos e formulações à base de extratos vegetais (subprodutos da cadeia produtiva do café) em plantas de tomateiro infectadas com *X. perforans*.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de formulação de fosfito e de uma formulação à base de subprodutos da cafeicultura na atividade enzimática e na expressão de genes que codificam enzimas do processo antioxidante do tomateiro em resposta à *X. perforans*.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas plantas de tomateiro cultivar Santa Clara. A obtenção dos isolados de *Xanthomonas perforans* e a inoculação foram realizadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente (Itens 2.1 e 2.2 do Capítulo 2).

### 2.1 Produtos alternativos na resposta de defesa induzida do tomateiro contra mancha-bacteriana

Os dois tratamentos que apresentaram maior eficiência no controle da mancha-bacteriana do tomateiro (Capítulo 2) foram selecionados para a realização deste experimento. A verificação do seu efeito indutor ocorreu por meio da análise da expressão de genes e por meio da atividade de enzimas de defesa. Os tratamentos selecionados foram o Fulland<sup>®</sup> (fosfito de cobre) na dose de 3 mL. L<sup>-1</sup> e o Green Force CuCa<sup>®</sup> (formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira) na dose de 10 mL. L<sup>-1</sup>, além de uma testemunha (água).

Neste ensaio há dois grupos de tratamentos, um corresponde às plantas de tomateiro pulverizadas com Fulland<sup>®</sup>, com Green Force CuCa<sup>®</sup> e com água, sem inoculação de *X. perforans*, e o outro grupo corresponde às plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup>, Green Force CuCa<sup>®</sup> e água, com inoculação da bactéria.

O experimento foi realizado em delineamento de blocos casualizados com três repetições e duas plantas por parcela por época de coleta. Os tratamentos foram pulverizados nas plantas de tomateiro com 20 dias depois da emergência das plantas, com a utilização de um pulverizador manual. A inoculação da *X. perforans* foi realizada quatro dias após a pulverização como descrito anteriormente. Amostras de duas folhas de tomateiro de cada tratamento

foram coletadas aos 0, 1, 2, 4, 5, 6 e 7 dias após pulverização dos produtos (dap). As mesmas foram armazenadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80°C para posteriores análises.

## **2.2 Desenho dos *primers* para RT-qPCR**

Para o desenho dos *primers*, foi utilizado o *software Integrated DNA Technologies (IDT)* (<http://www.idtdna.com/site>). Foram desenhados *primers* específicos para genes de sinalização e defesa na interação tomateiro-patógeno (Tabela 1). Cerca de 100-200 pb foram amplificados por cada gene estudado, 40 a 60% de citosina e guanina, com temperatura de anelamento de 58°C a 62°C. Com base na literatura, além desses foram escolhidos os genes GAPDH e  $\alpha$ -Tubulina como genes de referência, potencialmente ideais para a normalização da expressão gênica em tomateiro de diversos tecidos (CHALUPOWICS et al., 2010; GHAREEB et al., 2011a).

Tabela 1 Sequência dos *primers* utilizados para análise de RT-PCR

Nome	Sequência	Nº de acesso
<i>GAPDH</i>	F: GTTGGTGACAGCAGGTCAAGC R: CCAGCAGCATCAATCAAGCCTTAGC	U97257
<i>Chitinase classe II</i>	F: GCAGCAGGGAGTGCAATAGGTGT R: GTGCTGTCATCCAGAACCACAACG	U30465
<i>Inibidor de poligalacturonase</i>	F: CAACCGGATAAATGCTCTCACCGT R: CGCAATTGCAGGTGGAATTGTTCC	L26529
<i>PR-5</i>	F: GATTGTGGTGGAGTCCTGGATTGC R: GTGAACCAGGGCATTACCGT	AJ277064
<i>Peroxidase</i>	F: CGGTTCCATCCTCATTCTGGTACTG R: CAGCTTCAATTTGCTGCTTAGCATCG	X94943
<i>phenylalanine ammonia lyase</i>	F: CGGGTGAAAAAGTTCGATCACCTGGT R: GATTGGAAGAGGAGCACCATTCCAGC	M83314
<i>Catalase</i>	F: GCAGGGGAGAGGTACAGATCATGG R: GGCTTCACAGTGAGACGAGAAGCG	SGN- U578839
<i>Superoxido dismutase</i>	F: CGGTGAGGTGAAGATTCAGCAACTAG R: ATGGTTCAACCCCAATTCAAAGGCG	SGN- U581590
<i><math>\alpha</math>-Tubulina</i>	F: CCTGGTGGTGACCTTGCTAAG R: CTCACCGACATACCAATGCAC	TC170178

*Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (GAPDH); sequência de *primer reverse* (R); sequência de *primer forward* (F).

### 2.3 Extração de RNA de tomateiro e síntese de cDNA

As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em almofariz. Aproximadamente 100 mg de cada amostra macerada foi utilizada para a extração de RNA total. Para essa extração, foi utilizado o kit SV Total RNA Isolation System (Promega®) seguindo o protocolo para tecidos de plantas. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-100 (NanoDrop Technologies™). Apenas amostras de

RNA com relação 260/280 de 1,9 e 2,1 e 260/230 maior do que 2,0 foram utilizadas para as análises subsequentes. A integridade das amostras de RNA também foi avaliada em eletroforese com gel de agarose a 1,5%.

#### **2.4 Síntese de cDNA e análise dos *primers* por RT-PCR**

Uma alíquota contendo 650 ng de RNA total foi utilizada para a síntese do cDNA utilizando “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems®) seguindo as instruções do fabricante. Os cDNA foram armazenados a -20°C até a utilização posterior na RT-PCR.

Para certificar a identidade de amplificação dos *primers* confeccionados para as análises de expressão gênica por RT-qPCR, foi conduzida a reação de amplificação, utilizando 1 µL do cDNA na diluição 1:5 (v:v); 0,2 µL de *primer forward* e 0,2 µL de *primer reverse*, 7,5 µL enzima *Go Taq DNA polimerase Master Mix Colorless* (Promega®) e água Mili-Q estéril, num volume final de 15 µL. Utilizou-se o termociclador *Applied Biosystems*, cujo ciclo de reação foi: desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 40 segundos, anelamento a 58°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos e, por último, 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE 1 X, por eletroforese conduzida a 50 V durante 2 horas.

#### **2.5 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)**

Para cada gene, foram realizadas três repetições biológicas, com três repetições técnicas e também foi utilizado o controle negativo (água). As análises de RT-qPCR foram conduzidas em *software 7.500 Sequence Detector System* (*Applied Biosystems*), do Laboratório Central de Biologia Molecular da

UFLA. Utilizou-se 1 µL de cDNA na diluição 1:5 (v:v); 0,2 µL de cada um dos *primers* a 10 µM; 1X de *SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). A amplificação conduzida em incubações iniciais a 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min e finalizando com 95°C por 15 segundos, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A curva de *melting* foi determinada após o término dos ciclos de reações de cada produto amplificado entre 72 e 95°C.

*Ct* (*Cycle Threshold*) foi utilizado para determinar a diferença da expressão gênica entre os tratamentos e seu controle para os diferentes tempos de coletas. Os valores de expressão para cada uma das amostras foram normalizados pelos genes de referência *GAPDH* e  $\alpha$ -*Tubulinae* calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes, de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

## **2.6 Análises bioquímicas**

Avaliou-se a atividade das enzimas peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), fenilalanina amônia-liases (PAL, EC 4.3.1.5), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).

### **2.6.1 Determinação da atividade de guaiacol peroxidases, fenilalanina amônia-liases e das proteínas totais**

Para obtenção dos extratos enzimáticos que foram utilizados na determinação da atividade das enzimas POX e PAL, amostras de 0,2 g de tecido foliar fresco foram maceradas com N<sub>2</sub> líquido em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi

homogeneizado em 1,3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 25 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para as determinações enzimáticas.

A reação das PAL foi iniciada após a adição de 5  $\mu$ L do extrato a uma mistura contendo 145  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 50  $\mu$ L 50 mM de *L*-fenilalanina. A mistura da reação foi incubada a 37°C durante 10 minutos. A absorbância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de 5.000  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (ZUCKER, 1965) foi utilizado para calcular a atividade das PAL, a qual foi expressa em  $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade das POX foi determinada pela oxidação do guaiacol de acordo com a metodologia de Kar e Mishra (1976). Uma mistura de 115  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 40  $\mu$ L de guaiacol 50 Mm e 40  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio 125 mM foi adicionada a 5  $\mu$ L do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm em espectrofotômetro a cada 10 segundos durante 2 minutos após adição do extrato a mistura. O coeficiente de extinção molar de 2,47  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  foi utilizado para calcular a atividade da POX (CHANCE; MAEHLEY, 1955), a qual foi expressa em mM de tetraguaiacol produzido por  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. Durante todo o processo, os microtubos foram cobertos com papel alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

### 2.6.2 Determinação da atividade da ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase

Para a obtenção do extrato foliar para determinar a atividade das enzimas APX, CAT e SOD, 0,2 g de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), contendo 10 mM de EDTA, 200 mM de ácido ascórbico e água. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 25 min a 4°C e o sobrenadante foi dividido em alíquotas que foram utilizadas como extrato para as determinações enzimáticas.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). A mistura de reação foi constituída com 100 µL do tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10 µL de ácido ascórbico 10 mM, 10 µL peróxido de hidrogênio 2 mM e 60 µL de água destilada. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL do extrato foliar e a atividade foi medida pela oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 3 min a 25°C. O coeficiente de extinção molar foi de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi utilizado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em mM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakmak e Marschner (1991). A mistura de reação foi constituída de 100 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 80 µL de água destilada e 10 µL de peróxido de hidrogênio 250 mM. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm durante 3 min a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995) foi utilizado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em mM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 30  $\mu\text{L}$  do extrato foliar em 170  $\mu\text{L}$  de mistura de reação constituída de 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 40  $\mu\text{L}$  de metionina 70 mM, 15  $\mu\text{L}$  de azul de p-nitro-tetrazólio (NBT) 1 mM, 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 10  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{L}$  de riboflavina 0,2 mM (DEL LONGO et al., 1993). A reação ocorreu a 25°C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e ocorreu a formação da cor azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi efetuada a leitura a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

## **2.7 Análises estatísticas**

O experimento foi realizado em fatorial, consistindo em sete épocas de coleta (1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8 dias) após a pulverização dos produtos (Fulland, Green Force CuCa e Testemunha) e inoculação com *Xanthomonas perforans*. Os dados da atividade das enzimas POX, CAT, SOD, APX e PAL foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 1998).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise da expressão de genes de defesa por RT-PCR

Os produtos amplificados nos géis através da RT-PCR possibilitaram a confirmação de que os *primers* dos genes *Peroxidase*, *Superóxido dismutase*, *Fenilalanina amônia-liase*, *Catalase* e os genes endógenos, *Alfa tubulina* e *GAPDH* não formaram dímeros e mostraram-se adequados para o estudo de expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real. Os *primers* dos genes *Inibidor de poligalacturonase*, *PR-5* e *Chitinase classe II*, mostraram-se inadequados para o estudo de expressão gênica, pois formaram dímeros, sendo estes impróprios para estudo (Figura 1).

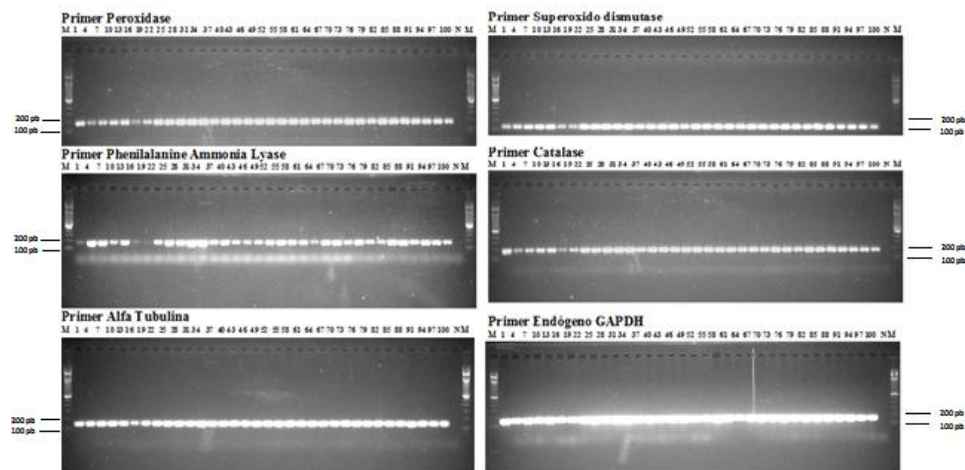


Figura 1 Amplificação das bandas a partir do *pool* das amostras das três repetições biológicas, por meio da RT-PCR. N: controle negativo (Água + *primer*), M: marcador de peso molecular 100 pb Ladder (Invitrogen)

### 3.2 Análise da expressão de genes de defesa por RT-qPCR

O estudo da expressão dos genes relacionados à defesa, por meio da técnica de RT-qPCR, demonstrou que plantas pulverizadas com os indutores de resistência Fulland® e Green Force CuCa®, inoculadas ou não com *Xanthomonas perforans* (*Xp*), apresentaram maior expressão dos genes *Catalase* (CAT), *Fenilalanina amônia-liase* (PAL), *Peroxidase* (POX) e *Superóxido dismutase*(SOD).

Há vários estudos que utilizam análises da expressão gênica para a compreensão das interações planta-patógeno. Dentre estes estudos, estão inclusos os de comparação de cDNAs específicos presentes em amostras distintas de plantas pulverizadas ou não pulverizadas com substâncias eliciadoras de plantas e infectadas por patógenos.

A ativação dos mecanismos de defesa induzidos é altamente complexa, pois diferentes tipos de genes e proteínas são diferencialmente expressos podendo ter um acréscimo ou decréscimo dos níveis de transcrição desses genes. Portanto, esses genes diferencialmente expressos podem ser identificados e conseqüentemente, terem suas funções metabólicas inferidas (VALENTE, 2012). Na análise da expressão do gene CAT, observou-se que a pulverização de Fulland® e Green Force CuCa® em tomateiro induziu a expressão do gene CAT aos 1 e 2 dias após pulverização (dap). Aos 4 dap, os níveis de transcritos em plantas pulverizadas com os indutores foram inferiores à testemunha pulverizada com água. Entretanto, plantas pulverizadas com Fulland® e Green Force CuCa® e inoculadas com *Xp*, apresentaram maior expressão do gene CAT aos 5 dap. Porém, este nível de expressão foi mantido apenas em plantas tratadas com Green Force CuCa® e inoculadas com a bactéria aos 7 dap (Figura 1a).

Para os níveis de transcritos do gene PAL, aos 1, 2 e 4 dap, não foi observado aumento na transcrição deste gene em plantas pulverizadas com os

indutores, em relação à testemunha. Entretanto, aos 5 dap, os níveis de expressão do gene PAL foram superiores em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> e inoculadas com *Xp*. Aos 6 dap, houve expressão significativa em plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> sem inoculação, e aos 7 dap, a expressão do gene PAL foi maior em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup>, sem inoculação. Aos 8 dap, não foi observada diferença entre os níveis de transcritos do gene PAL em plantas pulverizadas com os indutores, inoculadas ou não com *Xp*, em relação às testemunhas com e sem inoculação (Figura 1b).

A PAL atua nas respostas de defesa das plantas por reforçar as paredes celulares através da precursão da formação de lignina que atua contra invasão dos patógenos, catalisando a desaminação da fenilalanina a ácido trans-cinâmico, que é o precursor de todos os derivados de fenólicos (RAES et al., 2003).

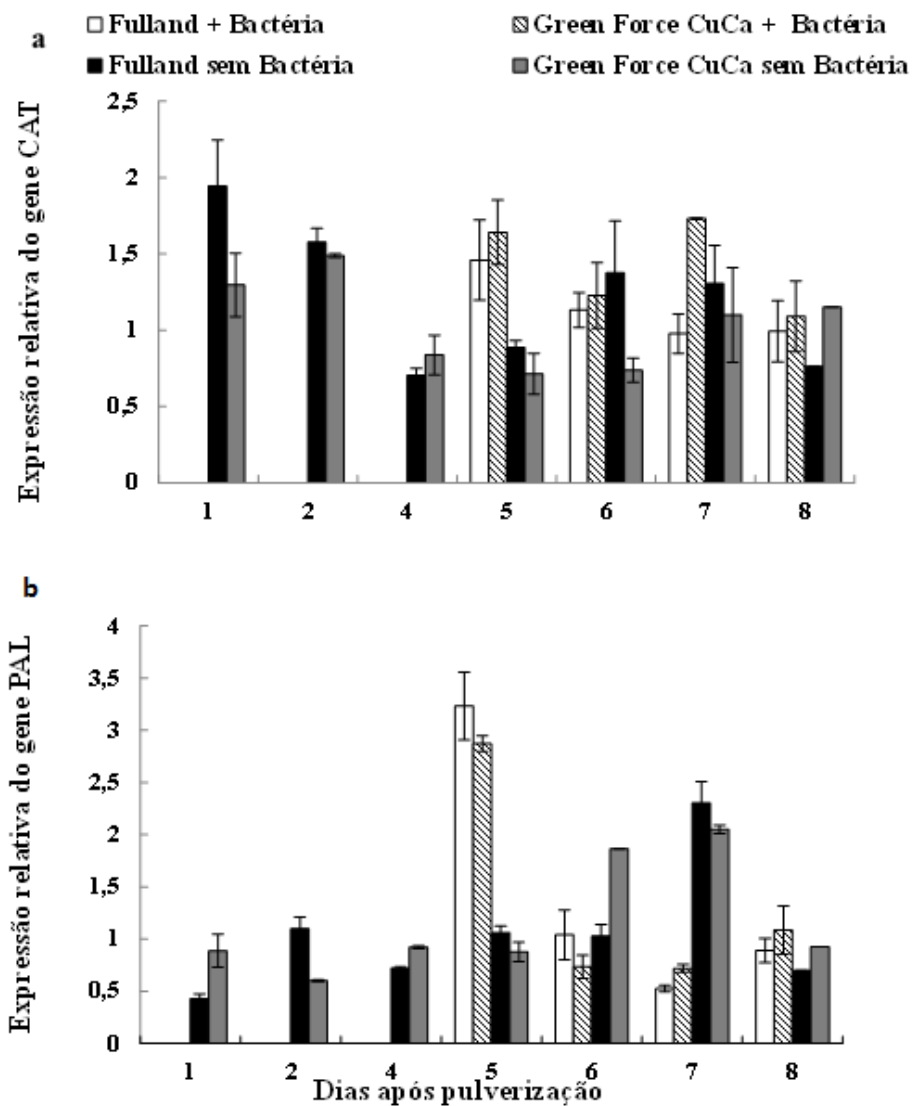


Figura 2 Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR dos genes *Catalase* (CAT) (a) e *Fenilalanina amônia-liase* (PAL) (b) aos 1,2, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após a pulverização dos tratamentos (dap). A inoculação da bactéria *Xanthomonas perforans* ocorreu aos 4 dap. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene Alfa tubulina

Para o gene da POX, em todos os períodos avaliados, observou-se que os níveis de transcritos em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup>, sem inoculação de *Xp*, foram semelhantes ou inferiores às plantas pulverizadas com água. Entretanto, aos 6 dap observou-se maior expressão do gene POX em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> seguido por Green Force CuCa<sup>®</sup> e aos 7 e 8 dap, observou-se aumento dos níveis de expressão do gene POX em plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> seguido pelo aumento em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> ambas inoculadas com a bactéria (Figura 2a).

As peroxidases atuam nas respostas de defesas de plantas, por contribuírem no processo de suberização, biossíntese de ligninas e na deposição de lignina ligada a glicoproteínas da parede celular (GASPAR et al., 1991) e participam também do sistema antioxidante na detoxificação de células (STICHER;MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Na análise dos níveis de transcritos do gene SOD, observou-se aumento da expressão deste gene em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup>, aos 2 e 4 dap. Aos 5 e 6 dap a expressão do gene SOD mostrou-se superior em plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> e inoculadas com *Xp*. Entretanto, aos 7 dap, os níveis de expressão deste gene foram superiores em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup>, ambos não inoculados. Porém, aos 8 dap, a expressão do gene SOD foi superior em plantas pulverizadas com os dois indutores em estudo, seguidos ou não de inoculação da bactéria, em relação às suas respectivas testemunhas (Figura 2b).

De acordo com Soares e Machado (2007), as enzimas CAT e SOD podem atuar como detoxificadoras eliminando os efeitos nocivos causados pelas EAO. A explosão oxidativa em princípio pode resultar do aumento da produção de EAO, que em excesso podem causar peroxidação lipídica e levar a perda da integridade da membrana do órgão da planta.

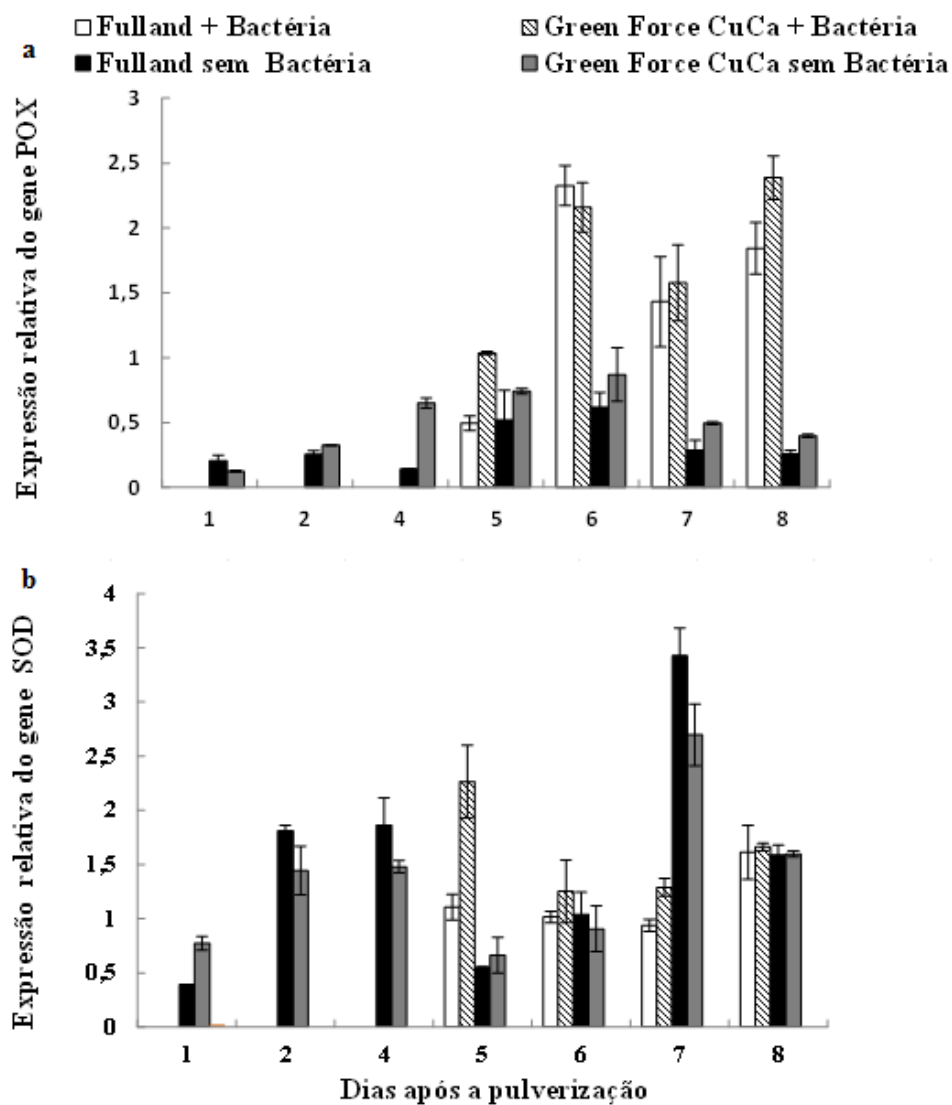


Figura 3 Perfil da expressão quantitativa relativa por qRT-PCR dos genes *Peroxidase* (POX) (a) e *Superóxido dismutase* (SOD) (b) aos 1,2, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após a pulverização dos tratamentos (dap). A inoculação da bactéria *Xanthomonas perforans* ocorreu aos 4 dap. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene Alfa tubulina

Os resultados deste trabalho comprovaram que os produtos Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> conduzem à ativação dos genes que codificam para as enzimas CAT, SOD, PAL e POX e que após a inoculação com *Xanthomonas perforans* a ativação desses mecanismos de defesa tornam-se mais intensas. O produto Green Force CuCa<sup>®</sup>, produzido a partir de subprodutos da indústria cafeeira, e o fosfito de cobre (Fulland<sup>®</sup>) mostraram-se eficientes na ativação dos genes CAT, POX, PAL e SOD. Foi observado também que plantas tratadas com estes indutores têm a ativação desses genes maior em plantas também inoculadas. E esse aumento na expressão dos genes que atuam nas respostas de defesa da planta pode demonstrar uma proteção contra o ataque da bactéria.

Em estudos sobre expressão da PAL e sua atividade em resposta a eliciadores, Shadle et al. (2003) observaram que quando o gene que codifica para a expressão da PAL está superexpresso em plantas de tabaco, ocorre também maior produção de ácido clorogênico e uma redução na sensibilidade à infecção pelo fungo *Cercospora nicotianae*. Gayoso et al. (2010) verificaram a expressão de genes da PAL em duas linhagens de tomateiro quase isogênicas após a inoculação com *Verticillium dahliae* e observaram que a linhagem que possuía o gene de resistência à *V. dahliae* apresentava resposta de defesa mais rápida ao patógeno.

Há relatos na literatura que demonstraram que a aplicação de eliciadores em plantas suscetíveis pode induzir de forma rápida as respostas de defesa a patógenos (RYALS et al., 1996). Conforme já demonstrado no trabalho de Medeiros et al. (2009), plantas de tomateiro pulverizadas com formulação NEFID e infectadas com *Xanthomonas vesicatoria* apresentaram maior expressão de genes relacionados a explosão oxidativa, como glutathione-S-transferase e superóxido dismutase.

Os produtos Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> possivelmente aumentaram a expressão dos genes CAT, SOD, PAL e POX por possuírem eliciadores que

transcrevem o ataque de um patógeno. A análise do efeito destes produtos sobre o perfil da expressão gênica dos genes em estudo, na ausência e presença do patógeno, indica que estes ativaram a expressão gênica de modo distinto para cada um dos genes. Foi demonstrado aumento de transcritos com a pulverização dos indutores sendo este potencializado após a inoculação. Esses resultados assemelham-se ao trabalho de Cardoso (2009) no qual observou que plantas de cafeeiro pulverizadas com ASM e extrato vegetal, induzem a ativação dos genes peroxidase e quitinase quando inoculados com *Hemileiavastatrix*.

Nardi et al. (2006), através das técnicas de PCR quantitativo em tempo real e de microarranjo, observaram que a pulverização com ASM em cafeeiro induziu a expressão de genes de defesa relacionados à explosão oxidativa e ao aumento de barreiras físicas e químicas (glutathione-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e lipoxigenase). A rapidez nessas mudanças transcricionais após a inoculação pode estar ligada ao reconhecimento de padrões moleculares ligados ao patógeno, pois na planta após a inoculação há a ativação dos mecanismos iniciais de percepção e transdução de sinais fazendo com que as proteínas receptoras das células da planta hospedeira induzam a expressão de genes de defesa e compostos de defesa (GUZZO, 2004).

De acordo com Ghareeb et al. (2011b), estudando a murcha bacteriana do tomateiro, verificaram a possibilidade do silício apresentar um papel ativo na potencialização e pré-condicionamento (*priming*) da expressão de genes que codificam enzimas de defesa em plantas inoculadas com *R. solanacearum*, demonstrando o papel deste elemento em realizar essa defesa da planta em nível transcricional.

Esses resultados demonstraram o efeito aditivo da expressão dos genes que codificam para as enzimas da CAT, SOD, PAL e POX, na presença de indutores e posteriormente de patógeno em mudas de tomateiro suscetíveis à



mancha-bacteriana, tendo os perfis de expressão variados em relação ao indutor utilizado e ao gene analisado.

### **3.3 Determinação da atividade das enzimas peroxidases, catalases, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e fenilalanina amônia-liases**

Houve interação entre as plantas pulverizadas com os produtos e as épocas de coleta para as enzimas POX, CAT, APX e PAL (ANEXO A - Tabela 1).

Para a atividade da POX, plantas do tratamento Green Force CuCa<sup>®</sup> apresentaram maior atividade do que as plantas do tratamento Fulland<sup>®</sup> quando comparados à testemunha aplicadas com água destilada ao 1 dap. Entretanto, aos 2 dap, os tratamentos Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> não diferiram entre si, porém, apresentaram maior atividade em relação à testemunha. Aos 4 dap, o Fulland<sup>®</sup> foi maior na atividade da POX que o Green Force CuCa<sup>®</sup> e estes tiveram uma maior atividade do que a testemunha (ANEXO A – Tabela 2).

Com as análises da enzima POX antes da inoculação, é possível concluir que os produtos Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> começaram a induzir a ativação dessa enzima desde o 1dap, agindo como eliciadores da planta. Entretanto, esses produtos agem de forma diferente na atividade da mesma em relação aos tempos analisados. De acordo com Resende et al. (2006), quando os receptores das plantas reconhecem os eliciadores da mesma, canais de íons são ativados, gerando a movimentação de íons principalmente do H<sup>+</sup>, esta contribui para a alcalinização da matriz extracelular a qual ativa a atividade da POX.

Na indução de resistência de plantas, a enzima POX é uma das enzimas que participa do sistema antioxidante de plantas atuando como detoxificadora das células, pois catalisa a redução de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, atua no processo de reforço da parede celular, a partir do aumento

da biossíntese de lignina e da suberização, para tentar inibir a entrada de patógenos (SILVA et al., 2008).

Itako et al. (2012) verificaram maior atividade das enzimas POX, polifenoloxidase (PPO) e  $\beta$ -1,3-glucanase em plantas de tomateiro pulverizadas com piraclostrobina e ASM e essa atividade foi maior quando as plantas eram infectadas por *X. perforans*. Cavalcanti et al. (2006a) relataram que a resistência induzida em plantas pulverizadas com ASM e Ecolife<sup>®</sup> foi evidenciada pelo aumento da atividade de POX e PPO.

Segundo Medeiros et al. (2009), extratos de folhas de cafeeiro além de induzir a expressão de genes de defesa em tomateiro, proporcionam maior atividade das enzimas de defesa como a peroxidase, fato observado no presente trabalho.

Já para a atividade da catalase, o tratamento Fulland<sup>®</sup> foi maior significativamente na ativação da mesma em relação ao Green Force CuCa<sup>®</sup> e ambos maiores que a testemunha ao 1 dap. Nos outros períodos de coleta, as plantas pulverizadas com os produtos não diferiram significativamente da testemunha (ANEXO A - Tabela 2).

Pode-se dizer que o aumento da enzima CAT também ocorreu após a pulverização dos produtos, provavelmente devido ao aumento de espécies ativas de oxigênio, uma vez que a enzima CAT faz parte do sistema de detoxificação das EAO na planta (RESENDE et al., 2006).

As EAO ocorrem normalmente na célula vegetal, mas quando em excesso são tóxicas e podem causar o estresse oxidativo. Estas atuam também como sinalizadoras de respostas de defesa, ativando nas plantas um conjunto de enzimas antioxidantes, que agem protegendo e impedindo a ação tóxica das EAO às células da planta, tais como POX, APX, SOD e CAT (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Para a atividade da APX, só houve diferença significativa entre os tratamentos aos 2 dap, em que plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> tiveram maior atividade desta enzima em relação ao Fulland<sup>®</sup> e à testemunha os quais foram iguais entre si (ANEXO A - Tabela 2).

A enzima APX é uma das enzimas que removem o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando o ascorbato como agente redutor, gerando MDA (APEL; HIRT, 2004). A remoção do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser uma explicação para o aumento significativo dessa enzima aos 2 dap.

Os produtos Green Force CuCa<sup>®</sup> e Fulland<sup>®</sup> não promoveram a atividade da enzima PAL e SOD em relação à testemunha (ANEXO A - Tabela 2). A PAL atua na desaminação de L-fenilalanina, formando ácido transcinâmico e amônia e é de grande importância por participar da biossíntese de compostos fenólicos (KUHN et al., 2006).

Analisando as plantas pulverizadas com os produtos em estudo, inoculadas com a bactéria, ao longo do tempo, houve interação tripla (tratamentos x épocas de coleta x inoculação). Entretanto, para todas as coletas analisadas, foi significativa a atividade das seguintes enzimas: POX, CAT, APX e SOD (ANEXO A - Tabela 3).

Plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> + bactéria apresentaram maior atividade da POX em relação a plantas pulverizadas com Fulland somente aos 5 e 6 dap. Já para as plantas tratadas com Green Force CuCa<sup>®</sup>, as plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> e inoculadas com a bactéria, apresentaram maior atividade da POX do que plantas apenas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> aos 6 e 7 dap. Entre as plantas testemunha inoculada e testemunha absoluta só houve diferença significativa aos 5 dap, no qual a primeira teve maior atividade que a segunda (ANEXO A - Tabela 4).

Quando comparados os produtos pulverizados e inoculados com a presença da bactéria, a atividade da enzima POX foi maior em plantas

pulverizadas com o Fulland<sup>®</sup> + bactéria aos 5 e 8 dap quando comparadas com as plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria. Enquanto que aos 6 e 7 dap, a atividade dessa enzima foi maior em plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria se comparadas às pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> + bactéria (ANEXO A - Tabela 5).

Observa-se que após a inoculação por *X. perforans* houve alterações no metabolismo da planta pelo aumento da atividade enzimática da POX, independente do produto eliciador, pois Fulland<sup>®</sup> + bactéria ativou mais essa enzima aos 5 e 8 dap, e Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria induziu a ativação da POX nas plantas de tomateiro aos 6 e 7 DAP. Esses resultados demonstram que os produtos agem de forma protetora e as mesmas tornam-se mais capacitadas para responder à presença do patógeno. Portanto, sugere-se que há a indução de resistência associada à bactéria dentro da interação planta-patógeno deste estudo, pois sugere-se que o aumento significativo dessa enzima nos primeiros dias após a pulverização e após a inoculação está relacionado com a redução da severidade da doença, verificada pelo menor valor da AACPD.

Cavalcanti (2006c) observou proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana, promovendo a redução da severidade da doença pela indução de resistência associada a VLA (extrato aquoso tratado termicamente a partir de tecido necrosado seco de “Lobeira” e ramos infectados com o fungo *Crinipellis pernicioso*). Foi sugerido que provavelmente essa proteção está associada principalmente ao aumento das atividades de POX e PAL, e ao aumento na deposição de lignina nos tecidos foliares.

Quando analisados de forma isolada, plantas pulverizadas com o produto Fulland<sup>®</sup> + bactéria apresentaram uma maior atividade da CAT que em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> sem inoculação. Plantas pulverizadas com o Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria foram maiores para a atividade dessa enzima que plantas apenas com Green Force CuCa<sup>®</sup> aos 6 dap (ANEXO A - Tabela 4). Entretanto,

quando comparados os dois tratamentos Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria e Fulland<sup>®</sup> + bactéria não houve diferença entre estes ao longo do tempo (ANEXO A - Tabela 5).

Ibrahim (2012) relatou que plantas de tomateiro inoculadas com *X. vesicatoria* e pulverizadas com ácido salicílico apresentaram maior atividade das enzimas POX, PPO a partir do primeiro dia após a pulverização em comparação com a testemunha e que a atividade dessas enzimas POX, PPO e CAT foram aumentadas quando inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* em comparação com as plantas só pulverizadas.

A inoculação da bactéria não influenciou a atividade da SOD em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> aos 7e 8 dap, pois a enzima teve maior atividade nos tratamentos apenas pulverizados com Fulland<sup>®</sup> e não inoculado com a bactéria. Plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria apresentaram maior atividade da SOD que plantas apenas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup>, aos 5 dap, sendo este o único dia que houve diferença significativa entre os tratamentos. Entre as plantas testemunhas, o tratamento testemunha inoculada apresentou maior atividade dessa enzima quando comparado à testemunha absoluta aos 5 dap, sendo este também o único dia que diferiram significativamente (ANEXO A - Tabela 4).

Quando comparadas as plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup>+ bactéria e Fulland<sup>®</sup> + bactéria, só houve diferença entre os mesmos e a testemunha inoculada para a atividade da SOD aos 6 dap em que o segundo apresentou maior atividade dessa enzima que os demais (ANEXO A - Tabela 5).

Os níveis de produção da enzima SOD em plantas são dependentes diretamente da concentração do ânion superóxido, pois essa atua dismutando este ânion a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o aumento significativo da atividade da SOD somente após a inoculação, pode ser considerado uma evidência da produção de ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> como resultante da infecção por *X. perforans*, pois a enzima

SOD são dependentes diretamente da concentração deste composto (WANG; LÜTTGE; RATAJCZAK, 2004).

Cavalcanti et al. (2006b) relatam que as atividades da POX foram ativadas desde o primeiro dia pelo indutor VLA e que as atividades da SOD e CAT foram maiores apenas no final do processo infeccioso da doença. Esses resultados foram explicados pelos autores como sendo uma resposta típica em interações planta- patógeno compatíveis, e que esses aumentos da atividade nos últimos dias pode ser explicado pelo fato de que essas enzimas antioxidantes podem desempenhar um papel na redução do estresse oxidativo para restaurar o desequilíbrio imposto pela expansão das lesões bacterianas, enquanto que, no trabalho realizado por Kuzniak e Skalodowska (2005), a infecção de folhas de tomateiro por *Botrytis cinerea* resultou em decréscimo da atividade da SOD com o processo infeccioso da doença, o mesmo ocorreu para a atividade da CAT que foi elevada nas plantas inoculadas somente nos primeiros dias após a infecção acompanhada de uma queda significativa.

A atividade da enzima APX em plantas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> só diferiu aos 6 dap, sendo que nas pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> foi maior que nas pulverizadas com Fulland e inoculadas com a bactéria. Enquanto que em plantas pulverizadas com Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria a atividade da APX foi maior que em plantas apenas com Green Force CuCa<sup>®</sup> aos 7 dap (ANEXO A - Tabela 4).

Entre os tratamentos Green Force CuCa<sup>®</sup> + bactéria e Fulland<sup>®</sup> + bactéria, o primeiro apresentou maior atividade da enzima APX, do que o segundo e em comparação à testemunha inoculada aos 7 e 8 dap (ANEXO A - Tabela 5).

No presente estudo, foi possível observar a tentativa de remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através das atividades das enzimas antioxidantes CAT, POX, APX e SOD que acompanharam a elevação da concentração desse composto.

Para a atividade da PAL, antes da inoculação, não houve diferença significativa entre os tratamentos em cada época de coleta, independente se as plantas foram ou não inoculadas (Tabela 3).

Itako et al. (2012) observaram em relação à atividade enzimática da PAL, que nenhum dos genótipos de tomateiro dos ensaios respondeu à produção das enzimas PAL e protease, tanto com o indutor ASM como a aplicação dos outros fungicidas e antibiótico. Resultado similar foi encontrado no trabalho de Cavalcanti et al. (2006a), no qual relataram também uma tendência de queda nas atividades da PAL a partir de 3 dap.

A importância em se preparar as plantas antes de receber o patógeno está relatada no trabalho de Kavitha e Umesha (2008). Estes autores mostraram que há uma correlação significativa entre o grau de resistência do hospedeiro e os níveis de enzimas, pois as atividades da PAL e PPO aumentaram em cultivares resistentes mais do que nas cultivares suscetíveis e altamente suscetíveis após a inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*.

Isso pode indicar que quando as plantas deste estudo foram incitadas com um elicitor, estas se tornaram mais resistentes, por isso essa pode ser uma explicação de plantas inoculadas, pulverizadas antes com um elicitor terem maior atividade de enzimas relacionadas à defesa do que nas plantas só pulverizadas ou só inoculadas.

No presente estudo, pode-se concluir que os tratamentos Green Force CuCa<sup>®</sup> e Fulland<sup>®</sup> induziram as respostas de defesa da planta, pois houve maior atividade das enzimas peroxidases, catalases, ascorbato peroxidase após a pulverização, a inoculação também influenciou no aumento da atividade das mesmas incluindo à Superóxido dismutase, porém a atividade de cada enzima após a pulverização e após a inoculação ao longo do tempo ocorreu de forma diferente. A atividade da PAL não foi aumentada nas plantas de tomateiro, nem

os produtos nem a inoculação influenciaram no aumento da atividade dessa enzima.



#### **4 CONCLUSÃO**

Os tratamentos Fulland<sup>®</sup> e Green Force CuCa<sup>®</sup> induzem a expressão dos genes CAT, SOD, PAL e POX, além disso, aumentam a atividade das enzimas de defesa CAT, SOD, APX e POX em plantas de tomateiro suscetíveis a mancha-bacteriana.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, D.; PRASAD, K.; STEWART, R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, Dec. 1995.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 90, p. 106-116, 1989.

ARAÚJO, E. R. et al. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *Xanthomonas gardneri*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 914, p. 39-42, Nov. 2011.

BEUACHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, p. 276-287, 1971.

BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real time RT-PCR e a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

CAKMAK, L.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 3, p. 463-468, Nov. 1991.

CANÇADO JÚNIOR, F. L. et al. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate para mesa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 7-18, 2003.

CARDOSO, D. C. **Análise quantitativa de expressão gênica de quitinase e peroxidase induzida por acibenzolar-S- metil e extrato vegetal contra *Hemileia vastatrix***. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-338, jul./ago. 2006a.

CAVALCANTI, F. R. et al. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 198-208, Apr./June 2006b.

CAVALCANTI, F. R. et al. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis perniciosa*. **Biological Control**, Orlando, v. 39, n. 3, p. 408-417, Dec. 2006c.

CHALUPOWICS, L. et al. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 3, p. 252-261, Mar. 2010.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 1, n. 2, p. 764-775, 1995.

DEL LONGO, O. T. et al. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 1023-1028, 1993.

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

GASPAR, T.H. et al. Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: LOBARZEWSKI, J. et al. (Ed.). **Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Genève: Université de Genève, 1991. p. 249-280.

GAYOSO, C. et al. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 232, Oct. 2010.

GHAREEB, H. et al. Silicon and *Ralstonia solanacearum* modulate expression stability of housekeeping genes in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, n. 4, p. 176-179, Apr. 2011a.

GHAREEB, H. et al. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, n. 3, p. 83-89, Jan. 2011b.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v.59, p. 309-314, 1977.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Engenharia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba, 2004.

IBRAHIM, Y. E. Activities of antioxidants enzymes in Salicylic acid treated tomato against *Xanthomonas vesicatoria*. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 6, n. 27, p. 5678-5682, July 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

**Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA)**. Rio de Janeiro, 2013. 122 p. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201304.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201304.pdf)>. Acesso em: 14 jun. 2013.

ITAKO, A. T. et al. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia**, Arica, v.30, n.2, p. 85-92, 2012.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 147-154, Jan. 2000.

JONES, J. B. et al. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 6, p. 755-762, Nov. 2004.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 57, p. 315-319, 1976.

KAVITHA, R.; UMESHA, S. Regulation of defense-related enzymes associated with bacterial spot resistance in tomato. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 36, n. 2, p. 144-159, 2008.

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

KUZNIAK, E.; SKLODOWSKA, M. Fungal pathogen-induced changes in the oxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. **Planta**, Berlin, v. 222, n. 2, p. 192-200, Oct. 2005.

LEITE, B. et al. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas: fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 235-280, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402-408, Dec. 2001.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, Sept. 2001.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.22, p. 867-880, 1981.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594-1605, 2006.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; LOPES, C.A. **Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2010. 28 p. (Circular Técnica, 84).

QUEZADO-SOARES, A. M. et al. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 38., 1998, Petrolina. **Anais...** Petrolina: SOB, 1998. p. 266.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in arabidopsis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, Mar. 2003.

RESENDE, M. L. V. et al. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógeno. **RAPP**, Rio de Janeiro, v. 14/15, p. 129-198, 2006.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 123-130, 2003.

ROOK, F.; BEVAN, M. W. Genetic approaches to understanding sugar response pathways. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 382, p. 495-501, 2003.

RYALS, J.A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, n.10, p. 1809-1819, Oct.1996.

SHADLE, G. L. et al. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 64, n. 1, p. 153-161, Sept. 2003.

SILVA, M. C. et al. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, n. 1/3, p. 29-38, Jan./Mar. 2008.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

TOYOTA, M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VALENTE, T. C. T. **Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina amônia liase ativados por indutores de resistência em cafeeiro**. 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

WANG, B.; LÜTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C<sub>3</sub> halophyte *Suaeda salsa* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 3, p. 285-293, Mar. 2004.

WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under Field conditions. **The Journal of Agricultural Science**, New York, v. 147, n. 5, p. 523-535, 2009.

ZUCHER, M. Induction of phenylalanine de aminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 40, p. 779-784, 1965.



## ANEXOS

## ANEXO A - Tabelas

**Tabela 1** Resumo da análise fatorial da atividade das enzimas peroxidase (POX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), catalase (CAT) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), ascorbato peroxidase (APX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), superóxido dismutase (SOD) ( $\text{Unid mg}^{-1}$  proteína) e fenilalanina amônia liase (PAL) ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em plantas de tomateiro pulverizadas com Fulland<sup>®</sup>, Green Force CuCa<sup>®</sup> e água destilada aos 1, 2 e 4 dias após a pulverização

	<i>P</i> valor		
	Tratamentos (Trat)	Época de coleta (EC)	Trat*EC
<b>POX</b>	0,0000	0,0139	0,0392*
<b>CAT</b>	0,0017	0,007	0,0000**
<b>APX</b>	0,0000	0,0003	0,0002**
<b>SOD</b>	0,0053	0,0001	0,1574 <sup>ns</sup>
<b>PAL</b>	0,7982	0,0000	0,0011**

Teste Scott Knott: \* significativo ao nível de 5% de probabilidade, \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. <sup>ns</sup> = não significativo.  $n = 3$ .

**Tabela 2** Análises das interações entre os fatores tratamentos e época de coleta para as atividades das enzimas peroxidase (POX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), catalase (CAT) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), ascorbato peroxidase (APX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), superóxido dismutase (SOD) ( $\text{Unid mg}^{-1}$  proteína) e fenilalanina amônia liase (PAL) ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em plantas de tomateiro pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> (T4), Green Force CuCa (T5) e água destilada (T6)

Tratamentos	POX			CAT		
	Dias após pulverização			Dias após pulverização		
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>
Fulland	23,78 B	18,09 A	29,70 A	0,58 A	0,42 B	0,19 C
Green Force CuCa	30,70 A	22,08 A	22,40 B	0,46 B	0,49 A	0,31 B
Água	8,51 C	6,47 B	10,08 C	0,17 C	0,49 A	0,76 A
	APX			PAL		
	Dias após pulverização			Dias após pulverização		
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>
Fulland	0,35 A	0,56 B	0,35 A	0,13 A	0,07 A	0,10 A
Green Force CuCa	0,53 A	2,00 A	0,34 A	0,13 A	0,07 A	0,20 B
Água	0,09 A	0,16 B	0,28 A	0,10 A	0,05 A	0,20 B

Médias seguidas pela mesma letra, em cada linha, não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$  e  $P \leq 0,01$ ) pelo teste Scott Knott<sup>ns</sup> = não significativo.  $n = 3$ .

**Tabela 3** Resumo da análise fatorial da atividade das enzimas peroxidase (POX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), catalase (CAT) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), ascorbato peroxidase (APX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), superóxido dismutase (SOD) ( $\text{Unid mg}^{-1}$  proteína) e fenilalanina amônia liase (PAL) ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em plantas de tomateiro pulverizadas com Fulland<sup>®</sup> (T4), Green Force CuCa (T5) e água destilada (T6) em quatro épocas de coleta (EC) na presença ou ausência da mancha-bacteriana (*Xanthomonas perforans*) (bact).

<i>P valor</i>							
	Trat	EC	Bact	Trat*EC	Trat*bact	EC*bact	Trat*EC*Bact
<b>POX</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00**
<b>CAT</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00**
<b>APX</b>	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00**
<b>SOD</b>	0,00	0,00	0,35	0,00	0,17	0,00	0,00**
<b>PAL</b>	0,74 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	0,69 <sup>ns</sup>	0,65 <sup>ns</sup>	0,53 <sup>ns</sup>	0,72 <sup>ns</sup>

**Tabela 4** Análises das interações entre os fatores tratamentos, época de coleta e presença ou ausência da bactéria para as atividades das enzimas peroxidase (POX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), catalase (CAT) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), ascorbato peroxidase (APX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), superóxido dismutase (SOD) ( $\text{Unid mg}^{-1}$  proteína) e fenilalanina amônia liase (PAL) ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em plantas de tomateiro pulverizadas com Fulland<sup>®</sup>, Green Force CuCa e água destilada em quatro épocas de coleta (EC) na presença ou ausência da mancha-bacteriana (*Xanthomonas perforans*)

Trat	EC	POX		CAT		SOD		APX	
		bact	sem bact	bact	sem bact	bact	sem bact	bact	sem bact
Fulland	120	31,43 A	22,91 B	0,03 B	0,41 A	0,14 A	0,19 A	0,08 A	0,12 A
Fulland	144	33,02 A	25,51 B	0,47 A	0,19 B	0,51 A	0,17 A	0,13 B	0,51 A
Fulland	168	40,33 B	65,36 A	0,04 A	0,06 A	0,04 B	0,16 A	0,04 A	0,18 A
Fulland	192	42,12 A	43,36 A	0,15 B	0,83 A	0,04 B	0,24 A	0,35 A	0,39 A
Green Force CuCa	120	21,82 A	17,25 A	0,61 B	0,90 A	0,21 A	0,07 B	0,01 A	0,14 A
Green Force CuCa	144	43,76 A	22,16 B	0,78 A	0,03 B	0,11 A	0,13 A	0,33 A	0,44 A
Green Force CuCa	168	50,05 A	36,83 B	0,04 B	0,37 A	0,05 A	0,12 A	0,57 A	0,19 B
Green Force CuCa	192	33,61 B	44,62 A	0,19 B	1,57 A	0,08 A	0,17 A	0,48 B	0,78 A
Água destilada	120	17,53 A	11,25 B	0,54 A	0,32 B	0,27 A	0,14 B	0,10 A	0,04 A
Água destilada	144	22,19 A	19,62 A	1,01 A	0,05 B	0,12 A	0,05 A	0,28 A	0,19 A
Água destilada	168	24,76 A	20,15 A	0,06 B	0,74 A	0,07 A	0,09 A	0,20 A	0,15 A
Água destilada	192	26,00 A	21,57 A	0,34 A	0,17 B	0,20 A	0,15 A	0,24 B	0,42 A

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste Skott Knott. <sup>ns</sup> = não significativo.  $n = 3$ .

**Tabela 5** Análises das interações entre os fatores tratamentos, época de coleta e presença ou ausência da bactéria para as atividades das enzimas peroxidase (POX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), catalase (CAT) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), ascorbato peroxidase (APX) ( $\text{mM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), superóxido dismutase (SOD) ( $\text{Unid mg}^{-1}$  proteína) e fenilalanina amônia liase (PAL) ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em plantas de tomateiro pulverizadas com Fulland®, Green Force CuCa e água destilada em quatro épocas de coleta (EC) na presença ou ausência da mancha-bacteriana (*Xanthomonas perforans*) (bact)

Trat	EC	POX			CAT			SOD			APX		
		Fulland	GF	ADE	Fulland	GF	ADE	Fulland	GF	ADE	Fulland	GF	ADE
<b>Bact</b>	<b>5</b>	31,43 A	21,82 B	17,53 B	0,03 B	0,61 A	0,54 A	0,14 A	0,21 A	0,26 A	0,079 A	0,01 A	0,10 A
<b>sem bact</b>	<b>5</b>	22,91 A	17,25 A	11,25 B	0,41 B	0,89 A	0,31 B	0,18 A	0,06 A	0,14 A	0,12 A	0,01 A	0,03 A
<b>Bact</b>	<b>6</b>	33,01 B	43,76 A	11,25 C	0,47 C	0,78 B	1,01 A	0,51 A	0,11 B	0,12 B	0,12 B	0,01 A	0,28 A
<b>sem bact</b>	<b>6</b>	25,50 A	22,15 A	11,25 A	0,18 A	0,02 A	0,04 A	0,16 A	0,12 A	0,05 A	0,51 A	0,01 A	0,18 B
<b>Bact</b>	<b>7</b>	40,33 B	50,05 A	11,25 C	0,042 A	0,042 A	0,057 A	0,03 A	0,052 A	0,072 A	0,041 C	0,01 A	0,20 B
<b>sem bact</b>	<b>7</b>	65,36 A	36,82 B	11,25 C	0,062 C	0,37 B	0,74 A	0,15 A	0,12 A	0,072 A	0,17 A	0,01 A	0,15 A
<b>Bact</b>	<b>8</b>	42,11 A	33,61 B	11,25 C	0,14 B	0,18 B	0,33 A	0,03 B	0,078 B	0,072 A	0,35 B	0,01 A	0,23 B
<b>sem bact</b>	<b>8</b>	43,36 A	44,62 A	11,25 B	0,82 B	1,57 A	0,16 C	0,23 A	0,17 A	0,072 A	0,39 B	0,01 A	0,42 B

Médias seguidas pela mesma letra, em cada linha, não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$  e  $P \leq 0,01$ ) pelo teste Scott Knott. <sup>ns</sup> = não significativo.  $n = 3$ .