

**RESISTÊNCIA INDUZIDA A *Xanthomonas vesicatoria* EM  
TOMATEIRO E *Verticillium dahliae* EM CACAUEIRO POR  
EXTRATOS NATURAIS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA,  
FISIOLÓGICA E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ELICIADORES  
PROTÉICOS**

**FÁBIO ROSSI CAVALCANTI**

**2005**

**FÁBIO ROSSI CAVALCANTI**

**RESISTÊNCIA INDUZIDA A *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO  
E *Verticillium dahliae* EM CACAUEIRO POR EXTRATOS NATURAIS:  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E PURIFICAÇÃO  
PARCIAL DE ELICIADORES PROTÉICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Cavalcanti, Fábio Rossi

Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauero por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos/ Fábio Rossi Cavalcanti. -- Lavras: UFLA, 2005.

192 p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *X. vesicatoria*. 2. *V. dahliae*. 3. tomateiro. 4. cacauero. 5. indução de resistência. 6. ASM. 7. extratos naturais. 8. enzimas antioxidativas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 632.3  
- 632.952

**FÁBIO ROSSI CAVALCANTI**

**RESISTÊNCIA INDUZIDA A *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO  
E *Verticillium dahliae* EM CACAUEIRO POR EXTRATOS NATURAIS:  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E PURIFICAÇÃO  
PARCIAL DE ELICIADORES PROTÉICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.


APROVADA em 25 de abril de 2005

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza – DFP/UFLA

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu – DFP/UFLA

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira – DBBM/UFC

Prof. Dra. Dulcinéia de Carvalho – Eng. Florestal/UFLA

  
Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende  
(Orientador)  
DFP/UFLA

-----LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**A meus queridos avós Honorino e Severina.**

**DEDICO**

**Se o céu realmente existe, lá eles devem estar,  
ouvindo Bach ao órgão.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela possibilidade da realização do trabalho.

À FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, pelo consentimento da bolsa de estudos.

Ao Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende, pelas concessões feitas no decorrer do trabalho, que tornaram ágil a sua execução.

Ao Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira, por ter generosamente me albergado em seu laboratório, e por sua influente postura científica e orientação.

Aos Profs Dra. Dulcinéia de Carvalho, Dr. Mário Sobral de Abreu e Dr. Ricardo Magela de Souza, por sua participação na avaliação deste trabalho, propondo sugestões.

Ao Prof. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, por sua determinante influência e entusiasmo na investigação da Fisiologia Vegetal e levantamento de hipóteses. Sobretudo pela amizade.

Aos Profs. Denílson e Magnólia, pelas salutares discussões e orientação. Aos professores do DFP, especialmente, Prof. Ludwig, Prof. Mário Sobral, e Prof. Ricardo, por terem mostrado o quanto ainda tenho de aprender na vasta ciência das doenças de planta. Aos colegas do DFP, pelo mesmo motivo.

Aos amigos do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa e do Labplant, por serem fiéis companheiros, com quem sempre posso contar com ajuda.

Aos caras que tiveram realmente de me aturar em Lavras: Rafa, Remo, Irene, Val e Cristiano. À “equipe cacaeiro”: Pedro, Ricardo, Ana Beatriz e Carla.

Aos meus pais, Jonas e Carmem; meu irmão Leonardo, e Cristina Paiva, por todo o amor.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
<b>CAPÍTULO 1: Generalidades sobre indução de resistência e estresse oxidativo.....</b>	<b>01</b>
1 Introdução geral .....	02
2 Referencial teórico .....	04
2.1 A cultura do tomateiro e a mancha foliar causada por <i>X. vesicatoria</i> .....	04
2.2 A cultura do cacaueteiro e a murcha de <i>Verticillium</i> .....	05
2.3 Mecanismos de defesa de plantas.....	07
2.4 Percepção do patógeno.....	10
2.4.1 Barreiras físicas.....	11
2.4.2 Reconhecimento e resistência.....	12
2.4.3 Elicidores.....	13
2.4.4 Custos.....	16
2.5 Proteínas relacionadas à patogênese.....	16
2.6 O papel paradoxal do oxigênio na interação planta-patógeno...	20
2.6.1 Reações de hipersensibilidade (HR).....	20
2.6.2 Estresse oxidativo.....	22
2.6.3 Mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos....	23
3 Referências bibliográficas .....	26
<b>CAPÍTULO 2 : Eficácia comparativa de químicos e formulações naturais nas repostas de defesa do tomateiro contra a mancha foliar bacteriana.....</b>	<b>37</b>
1 Resumo .....	38
2 Abstract .....	39
3 Introdução .....	40
4 Material e Métodos .....	43
4.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	43
4.2 Descrição dos tratamentos.....	43
4.3 Toxidez direta sobre o patógeno, manutenção e inoculação do isolado.....	47
4.4 Quantificação de doença e coleta de material fresco.....	48
4.5 Determinações enzimáticas.....	49
4.6 Determinação de fenóis totais, lignina e pigmentos.....	52

4.7 Delineamento experimental e métodos estatísticos.....	53
5 Resultados.....	54
6 Discussão.....	80
7 Conclusões.....	85
8 Referências Bibliográficas.....	86
<b>CAPÍTULO 3: Atividades de enzimas antioxidantes e respostas fotossintéticas em tomateiro pré-tratado com indutores de resistência e infectado por isolado patogênico de <i>Xanthomonas vesicatoria</i></b> .....	92
1 Resumo .....	93
2 Abstract .....	94
3 Introdução .....	95
4 Material e Métodos .....	98
4.1 Material vegetal e condições de crescimento. Manutenção e inoculação do isolado de <i>X. vesicatoria</i> .....	98
4.2 Descrição dos tratamentos.....	99
4.3 Coleta de material fresco para determinações enzimáticas.....	100
4.4 Determinações enzimáticas.....	100
4.5 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	102
4.6 Delineamento experimental e métodos estatísticos.....	103
5 Resultados.....	104
6 Discussão.....	112
7 Conclusões.....	117
8 Referências Bibliográficas .....	118
<b>CAPÍTULO 4: Proteção do cacaueteiro contra <i>Verticillium dahliae</i> Kleb. por químicos e formulações naturais, e respostas associadas de enzimas relacionadas à defesa</b> .....	124
1 Resumo .....	125
2 Abstract .....	126
3 Introdução .....	127
4 Material e Métodos .....	130
4.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	130
4.2 Descrição dos tratamentos.....	131
4.3 Manutenção e inoculação do isolado. Ensaio de inibição de germinação de conídio de <i>V. dahliae</i> .....	132
4.4 Quantificação de doença e coleta de material fresco.....	133
4.5 Determinações bioquímicas.....	135
4.6 Delineamento experimental e métodos estatísticos.....	136
5 Resultados e Discussão.....	137
6 Conclusões.....	161
7 Referências Bibliográficas .....	162



<b>CAPÍTULO 5: Prospecção da natureza protéica da eliciação em tomateiro tratado com diferentes frações de um extrato natural.....</b>	<b>166</b>
<b>1 Resumo .....</b>	<b>167</b>
<b>2 Abstract .....</b>	<b>168</b>
<b>3 Introdução .....</b>	<b>169</b>
<b>4 Material e Métodos .....</b>	<b>172</b>
<b>4.1 Preparo do extrato bruto de <i>S. lycocarpum</i>.....</b>	<b>172</b>
<b>4.2 Fracionamento por precipitação salina.....</b>	<b>172</b>
<b>4.3 Cromatografia de troca iônica.....</b>	<b>173</b>
<b>4.4 Pulverização e coleta de material fresco.....</b>	<b>174</b>
<b>4.5 Determinações bioquímicas.....</b>	<b>174</b>
<b>4.6 Eletroforese Bidimensional.....</b>	<b>175</b>
<b>5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>177</b>
<b>6 Conclusão.....</b>	<b>189</b>
<b>7 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>190</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A – Taxa fotossintética  
AACPD – Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença  
ABA – Ácido Abscísico  
AEX – *Anion Exchange Chromatography* (Cromatografia de troca aniônica)  
APX – Peroxidases de ascorbato  
ASM – Acibenzolar-S-metil. Derivado benzotiadiazole (BTH). Bion®  
BABA – Ácido  $\beta$ -aminobutírico  
BTH – Derivado benzotiadiazole. Éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-  
tiadiazole-7 carbotióico. Ver ASM (Bion®)  
CAD - cinamil-álcool desidrogenase  
CAT – Catalases  
CEX – *Cation Exchange Chromatography* (Cromatografia de troca catiônica)  
CHS – Chalcona sintase  
Ci – CO<sub>2</sub> subestomático  
CPA – Filtrado aquoso de micélio de *C. pernicioso*  
CPM – Suspensão aquosa de extração metanólica sobre micélio de *C. pernicioso*  
DAP – Dias Após Pulverização  
DBC – Delineamento em Blocos Casualizados  
E – Taxa de transpiração  
EC – Eficiência de Carboxilação  
EFID – Suspensão aquosa de extrato metanólico de folhas de cafeeiro infectadas  
por *H. vastatrix*  
EIA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*  
EUA – Eficiência do Uso de Água  
Fo – Fluorescência mínima  
FLO – Extrato aquoso a quente de pó de tecido sadio de lobeira (*S. lycocarpum*)  
Fv/Fm – Eficiência quântica máxima do PSII  
GLU -  $\beta$ -1,3-glucanases  
gs – Condutância estomática  
HAP – Horas Após Pulverização  
INA – Ácido Isonicotínico  
IRGA – *Infra-Red Gas Exchange Analyser*  
MCp – Extrato aquoso de micélio de *C. pernicioso*  
MeJA – Metil Jasmonato  
NBT – *Nitro Blue Tetrazolium*  
PAL – amônia-liases de fenilalanina  
PAMP – *Pathogen-associated Molecular Patterns*

PCD – *Programmed Cell Death*  
POX – Peroxidases de fenóis  
PPO – Oxidases de polifenóis  
PR-P – Proteínas relacionadas à patogênese  
RI – Resistência Induzida  
ROS – *Reactive oxygen species* (espécies ativas de oxigênio)  
SAR – *Systemic Acquired Resistance* (Resistência sistêmica adquirida)  
SOD – Dismutases de superóxido  
TBARS – Derivados de ácido tiobarbitúrico (medida de peroxidação de lipídios)  
TGA – Ácido tioglicólico  
Vd – *Verticillium dahliae*  
VLA – Extrato aquoso a quente de pó de tecido de (*S. lycocarpum*) infectado por  
*C. pernicioso*  
VLAF - Extrato aquoso a frio de pó de tecido de (*S. lycocarpum*) infectado por  
*C. pernicioso*  
VLM – Suspensão aquosa de extrato metanólico de pó de tecido de (*S.*  
*lycocarpum*) infectado por *C. pernicioso*  
Xv – *Xanthomonas vesicatoria*

## RESUMO

CAVALCANTI, F. R. Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauero por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos. 2005. 192 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A eficiência de extratos naturais e formulações comerciais sobre a indução de resistência em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e cacauero (*Theobroma cacao*), infectadas, respectivamente, com *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) e *Verticillium dahliae* (Vd), foi avaliada. Plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: pulverização foliar com suspensões heterogêneas de quitosana, filtrados de micélio de *Crinipellis pernicioso*, extratos aquosos de tecido necrótico de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectado por *C. pernicioso*, Acibenzolar-S-metil (ASM), Ecolife®, dentre outros. Plantas foram pulverizadas previamente com os tratamentos e depois inoculadas com os respectivos patógenos. Tratamentos mostraram-se efetivos na proteção das plantas de tomateiro e cacauero, destacando-se ASM e extratos a quente e a frio de pó de vassoura de lobeira. Plantas de tomate e de cacau submetidas aos tratamentos também mostraram alteração da atividade de peroxidases (POX) e oxidases de polifenóis (PPO), bem como significativo aumento na deposição de lignina, redução nos valores de fenóis totais e aumento na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (QUI). Plantas de tomate tratadas mostraram aumento na atividade de dismutases de superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidases de ascorbato (APX). As plantas de tomate não submetidas aos tratamentos mostraram declínio na assimilação de CO<sub>2</sub>, na taxa de transpiração, na eficiência de carboxilação e na taxa fotossintética e apresentaram alteração na eficiência do uso de água e eficiência de carboxilação. Dentre os tratamentos capazes de promover redução da mancha foliar em tomate, o extrato a frio de vassoura de lobeira, foi fracionado com sulfato de amônio e as frações foram então submetidas à cromatografia de troca catiônica. O pico retido em CM-celulose e o pico retido em DEAE-celulose quando aplicados em plantas de tomate levaram ao aumento da atividade de peroxidases.

\* Comitê de Orientação: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

## ABSTRACT

CAVALCANTI, F. R. **Induced resistance by natural extracts in tomato against *Xanthomonas vesicatoria* and cacao against *Verticillium dahliae*: biochemical, physiologic characterization and partial purification of proteic elicitors.** 2005. 192 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

The efficacy of natural extracts and commercial formulations on resistance induction of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) plants, infected, respectively, with *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) e *Verticillium dahliae* (Vd), was evaluated. Plants were submitted to pulverizations: chitosan suspensions, aqueous filtrates from *Crinipellis pernicioso* mycelium, aqueous extracts from necrotic tissue from branches of 'lobeira' bush (*Solanum lycocarpum*) infected with *Crinipellis pernicioso*, Acibenzolar-S-methyl (ASM), Ecolife® and others. Pulverizations with extracts were carried before pathogen inoculations. Treatments showed efficacy on reduction of disease progress curve. ASM and aqueous extracts from 'lobeira' showed best results. Tomato and cocoa plants submitted to treatments also showed alteration on phenol peroxidases (POX) and polyphenol oxidases (PPO) activities. In these plants there were increase on lignin deposition and total phenolic compounds reduction. Expression of resistance induced by studied treatments was evidenced also on increase of  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases activities. ASM and aqueous extracts from 'lobeira' treated plants showed increase of activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX). Significant differences between treated and not treated plants regarding gas exchange photosynthetic indicators and chlorophyll a fluorescence parameter were observed. Infected not treated plants showed decreased CO<sub>2</sub> assimilation, transpiration rate, stomatal conductance and photosynthetic rate. Water use efficiency and carboxylation efficiency were also strongly affected in control plants. Among the treatments that promoted reduction of leafy spot on tomato, the aqueous cold extract from necrotic tissue from 'lobeira' was fractionated with ammonium sulphate and these fractions were submitted to cation exchange chromatography. The retained peak in CM-cellulose and the retained peak in DEAE-cellulose when applied on tomato plants induced increase of peroxidase activities.

\* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Adviser); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

## **CAPÍTULO 1**

# **GENERALIDADES SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E ESTRESSE OXIDATIVO**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Perdas ligadas a doenças de planta são problemas inerentes à produção agrícola e podem ser evidenciadas em todo mundo. O manejo corrente de controle de doenças baseia-se no uso, muitas vezes indiscriminado, de defensivos químicos sobre culturas de base genética restrita. Este quadro promove o surgimento de raças mais agressivas de patógenos, gerando um ciclo vicioso. No entanto, diante disso, alguns paradigmas vêm sendo quebrados, visando à sustentabilidade e eficiência do manejo de doenças. A adoção de práticas de Manejo Integrado de Pragas e Doenças (IPM) está, cada vez mais, sendo levada em consideração. O emprego da associação de medidas culturais, controle biológico e resistência induzida, em complementação ao controle químico, é alvo crescente de debate e aceitação de mercado.

Em decorrência do processo evolutivo, plantas desenvolveram numerosas respostas de defesa induzidas pelo ataque de patógenos virais, fúngicos e bacterianos; por injúria mecânica ou por estresse químico. Dentre tais respostas se encontram a síntese de fitoalexinas, a síntese e acumulação de proteínas relacionadas à patogênese, tais como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, e o fortalecimento da parede celular pela deposição de lignina e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Oelofse e Dubery, 1996).

Considerando-se que novas alternativas precisam ser encontradas e utilizadas como parte do manejo integrado, uma possibilidade poderia advir do uso da resistência induzida (RI), cujo mecanismo de ação, inespecífico, foi desenvolvido durante a evolução das plantas, como resposta ao ataque de diversos inimigos naturais. A ação de amplo espectro de genes de defesa devidamente ativados poderia então ser somada com a ação de genes de resistência para proporcionar em plantas cultivadas uma resistência mais estável

e durável frente a diferentes raças de determinado patógeno, ou mesmo, frente a diferentes patógenos.

A RI ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e/ou estruturais, aumentando a resistência geral da planta (Uknes *et al.*, 1996). A proteção obtida contra determinado patógeno pode ser local ou sistêmica, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador). A sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas, ou mesmo durar todo o ciclo de vida da planta, passando assim a funcionar como um mecanismo de defesa constitutivo (Pascholati e Leite, 1995). Nesse sentido, a pesquisa envolvendo RI representa atualmente uma importante fonte de dados para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo integrado de pragas e doenças e enriquecimento da literatura sobre Controle de doenças.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a eficácia de químicos e formulações naturais na proteção de tomateiro e cacauete desafiados, respectivamente, por *Xanthomonas vesicatoria* e *Verticillium dahliae*. Foi avaliada, também, a influência desses tratamentos em respostas fisiológicas de indução de resistência, nessas plantas. Adicionalmente, foram conduzidas análises preliminares da identificação de proteínas eliciadoras presentes em um dos extratos naturais testados.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do tomateiro e a mancha foliar causada por *X. vesicatoria*

De acordo com informações de domínio público, disponíveis em periódico da CEAGESP (2005), o tomateiro é originário de uma região situada no norte do Chile até o Equador, entre o Oceano Pacífico e os Andes e foi domesticado no México, de onde foi levado para a Europa no período entre 1535 a 1544. Inicialmente, o tomateiro foi usado como planta ornamental, e era considerado venenoso pelos europeus. Somente a partir do século XIX ele passou a ser consumido como alimento e logo se difundiu pelo mundo todo, e é hoje uma hortaliça de grande importância e de altíssimo valor econômico para muitos países. No Brasil, o tomateiro foi introduzido pelos imigrantes italianos na virada do século XX, e desenvolveu-se rapidamente a partir da década de 70, colocando o Brasil entre os maiores produtores mundiais. O mercado de tomate no Brasil é caracterizado pelo giro da ordem de 1,5 bilhão de reais, com produção de cerca de 3 milhões de toneladas/ano e cultivo de 58 mil hectares, envolvendo diretamente mais de 200 mil pessoas na produção.

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) pertence à subclasse *Sympetalae*, ordem *Tubiflorae*, família *Solanaceae* (Agarez et al., 1994). A cultura destaca-se como bastante importante para fitopatologistas, pois apresenta um amplo histórico de problemas fitossanitários.

Mancha foliar bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas vesicatoria* aparece como um fator de queda de rendimento na produção comercial de tomate, especialmente em regiões temperadas (Al-Dahmani et al., 2003), pois a doença é favorecida por clima quente e úmido (Martin et al., 2004). Estratégias de controle são baseadas em uma combinação de práticas, tais como uso de sementes e mudas livres de patógenos e contaminantes, eliminação de plantas

invasoras, uso de cultivares resistentes e adoção de calendário de aplicação de misturas baseadas em Mancozeb e cobre (Obradovic et al., 2004). A doença pode se dispersar secundariamente através do salpique da água da chuva ou de água de irrigação mal dimensionada. Uma vez estabelecida a doença no campo de produção, as estratégias de manejo da doença disponíveis hoje são apenas parcialmente eficazes para o controle da mancha bacteriana (Al-Dahmani et al., 2003).

Para a integração dos métodos correntes no manejo da doença, pesquisas envolvendo RI podem contribuir com aumento da eficiência das estratégias de controle da mancha foliar bacteriana, trazendo benefícios para a cultura do tomateiro.

## **2.2 A cultura do cacau e a murcha de *Verticillium***

O cacau, *Theobroma cacao* L. (fam. *Sterculiaceae*), era conhecido como “alimento dos deuses”, na época em que Linneaus ajustou o seu nome para o sistema binomial (Pachioli, 2001). Muitos eventos levaram o cacau a adquirir esta elevada condição, contudo poucos são relatados. A grande maioria das histórias que cercam o cacau, uma planta arbórea, dotada de folhas com limbo amplo e originária da Amazônia peruana, envolvem o chocolate como produto de suas amêndoas. No entanto, além do chocolate, outros derivados do processamento do cacau, como a manteiga, a polpa e o pó, são utilizados pela indústria de cosméticos e de alimentos (Purdy e Schmidt, 1996).

De acordo com a LMC International, ED&F Man, International Cocoa Organization, a safra mundial (2000/01) produziu cerca de 2,8 milhões de toneladas, com uma projeção para novas safras a partir de 2,9 milhões de toneladas (American Cocoa Research Institute, 2001), salientando que a África ocidental detém cerca de 70% da produção mundial. A Costa-do-Marfim mantém sua posição de maior produtor mundial, seguido por Gana, Nigéria e

Camarões, os quais apresentam mercados em expansão. No Brasil, a produção de cacau na safra cresceu mais de 30% a partir de 2001, em relação à última década.

O gênero *Verticillium* apresenta seis conhecidas e bem disseminadas espécies de patógenos capazes de infectar uma vasta gama de dicotiledôneas, em regiões temperadas e subtropicais. Caracterizam-se por ser patógenos obrigatórios de natureza hemi-biotrófica. Desse gênero, duas espécies, *V. albo-atrum* e *V. dahliae*, estão ligadas ao solo, disseminando-se através da planta pelo xilema, e primariamente associadas com murchas vasculares. *V. albo-atrum* e *V. dahliae* constam como patógenos envolvidos em murchas vasculares, porém apenas *V. dahliae* produz microscleródios de resistência (Barbara e Clewes, 2003).

Em cacauzeiro, a murcha de *Verticillium* apresenta-se como um fator limitante de produção. É relatado que plantas infectadas por Vd desenvolvem sintomas muito próximos de plantas submetidas à restrição hídrica, tanto fisiológica quanto morfológicamente. Epinastia, necrose e abscisão em folhas caracterizam o sintoma. A atividade de *V. dahliae* no tecido vascular de hospedeiros inclui a oclusão do xilema por tiloses, impedindo transporte de água. As respostas similares associadas à seca e Vd poderiam estar relacionadas apenas a sinais de escassez de água. No entanto, efeitos tóxicos propriamente fúngicos não podem ser isolados (Sadras et al., 2000; Pomar et al., 2004), permanecendo alvo de pesquisa.

O manejo da Verticiliose está fundamentado na utilização da resistência genética associada a medidas culturais, como uso de mudas livres do patógeno, eliminação de resíduos infectados, irrigação e adubação equilibradas e aplicação de fungicidas sistêmicos. A resistência induzida poderia vir a se somar à introdução de material geneticamente resistente, de modo a evitar a

disseminação do patógeno em áreas isentas, lembrando que o controle da verticilose em cultura perene é basicamente curativo.

### **2.3 Mecanismos de defesa de plantas**

As plantas apresentam uma rede de mecanismos de defesa a patógenos. Dentre estes mecanismos existem aqueles pré-existentes e os que são induzidos como resposta à infecção. Os mecanismos pré-existentes consistem de barreiras físicas e compostos pré-formados. A parede celular primária, constituída de celulose, hemicelulose e pectina, é uma barreira natural que dificulta a entrada de patógenos. A parede celular pode ser reforçada pela deposição de lignina no caso de formação de parede secundária ou pela impregnação por sílica, cutina, ceras e ceras. A presença de tricomas tectores ou glandulares também se constituem em formas pré-existentes de proteção de plantas (Ride, 1983).

Além de barreiras físicas, produtos do metabolismo primário e secundário dos vegetais constituem outro importante mecanismo de defesa. Muitos desses compostos são produzidos de forma constitutiva independente da presença de patógenos, como é o caso dos taninos que são metabólitos secundários de baixa massa molecular (1200-1500 Da) que apresentam atividade antibiótica e ação inibitória contra insetos (Swain, 1977). No entanto, existem nos vegetais proteínas cujos genes têm sua expressão regulada por sinais liberados pelo processo de patogênese. Essas são as denominadas PR proteínas (Proteínas Relacionadas à Patogênese). São reconhecidas 17 famílias de PR-proteínas (Van Loon e Van Strien, 1999; Zhang et al., 1995; Wei et al., 1998; Okushima et al., 2000). Estas proteínas que apresentam funções variadas podem estar localizadas no apoplasto ou no vacúolo e podem ser induzidas por sinais endógenos ou exógenos à planta. Relatos na literatura demonstram que estas proteínas têm sua síntese aumentada em casos de infecção por patógenos (Loon, 1999).

Além de PR-proteínas, enzimas relacionadas com a síntese de fitoalexinas, fenilalanina amônia liase (PAL) e chalcona sintase (CHS), bem como enzimas envolvidas com produção de metabólitos secundários, lignificação e deposição de calose também podem ter a síntese aumentada como resultado da infecção por um determinado patógeno (Hammond-Kosack e Jones, 2000).

Os processos de defesa que são induzidos na planta envolvem três etapas: a percepção, a transdução e a tradução de sinais. Os sinais percebidos por receptores das células vegetais são denominados de eliciadores e apresentam natureza biótica ou abiótica. São exemplos de eliciadores abióticos íons metálicos, moléculas orgânicas sintetizadas em laboratório e luz UV (Pascholatti e Leite, 1994). Os eliciadores bióticos consistem, na grande maioria, em oligopeptídeos, carboidratos, glicoproteínas ou substâncias lipídicas. Estes eliciadores bióticos são considerados exógenos quando originados da parede celular do patógeno ou endógenos quando as moléculas são liberadas da própria célula vegetal (Leite et al., 1997).

Alguns modelos foram propostos para explicar o reconhecimento entre planta e patógeno. Entre os modelos propostos destaca-se o modelo gene-a-gene também conhecido como hipótese de Flor, proposta em 1942 (Hammond-Kosack e Jones, 2000). A hipótese pressupõe que para cada gene que determina uma reação de resistência em vegetais, existe um gene correspondente no patógeno que determina avirulência. Portanto, o reconhecimento do produto do gene *avr* de avirulência do patógeno pela planta que tem o gene *R*, resultará na ativação do sistema de defesa vegetal.

Uma vez percebido o sinal, a etapa de transdução consiste na transmissão deste sinal, que envolve mensageiros secundários, tais como: ácido benzóico, ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Estes compostos, ao que tudo indica, atuam direta ou indiretamente interferindo com a expressão de

genes que codificam para proteínas de defesa em plantas (Hammond-Kosack e Jones, 2000).

Outros hormônios vegetais, além do ácido jasmônico e do etileno também parecem estar envolvidos, de alguma forma, com as respostas de defesa. O ácido abscísico, mais relacionado com respostas da planta ao estresse abiótico, sinaliza para algumas PR-proteínas como é o caso da osmotina (Loon, 1999). As citocininas, por sua vez, parecem estar relacionadas com maior susceptibilidade da planta ao patógeno (Buchel e Linthorst, 1999). Quanto à ação de auxinas, foi relatado por Noël et al. (2001) que folhas de batata infectadas com *Phytophthora infestans* apresentaram uma redução da severidade da doença. No entanto, os dados disponíveis sobre o efeito das auxinas como sinalizador de mecanismos de defesa parecem contraditórios (Buchel e Linthorst, 1999).

Após a transdução dos sinais estes serão convertidos em respostas celulares específicas que podem levar a ativação de genes de defesa e de mecanismos de resistência. Os genes que codificam para enzimas envolvidas com a síntese de fitoalexinas, em geral, são os primeiros a serem induzidos, enquanto que os genes relacionados com PR-proteínas parecem ser induzidos mais tardiamente (Cordeiro e Sá, 1999).

No caso de interações incompatíveis entre o patógeno e o hospedeiro o processo de sinalização molecular pode levar a uma resposta local e rápida, conhecida como resposta hipersensitiva (HR). A HR apresenta-se como lesões necróticas no sítio de infecção que resultaria de um processo de morte celular programada ou seria causada por componentes tóxicos e espécies reativas de oxigênio, liberados pela própria célula vegetal. O estímulo gerado localmente pode ser transduzido sistemicamente, induzindo respostas distantes do sítio de infecção, levando, então, à chamada resistência sistêmica adquirida (SAR). Esta resposta, que tem como principal sinalizador o ácido salicílico, leva a uma redução significativa dos sintomas da doença após infecção subsequente de

outros patógenos (Hammond-Kosack e Jones, 2000). No entanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos com SAR ou com outros mecanismos de indução de resistência ainda não foram bem elucidados.

O caráter de resistência, definido como a capacidade do organismo em resistir, suprimir ou retardar os efeitos do ataque de organismos patogênicos pode ser herdado qualitativamente ou quantitativamente. No primeiro caso, considera-se a herança do tipo vertical ou monogênica, onde o caráter de resistência resulta da ação de um ou poucos genes, na grande maioria alelos dominantes. Este tipo de resistência está relacionado com a hipótese gene-a-gene. A herança vertical pode ser utilizada no retardo de epidemias. No entanto, este mecanismo de resistência pode ser facilmente quebrado em virtude da constante pressão de seleção pela qual a população de patógenos é submetida. Dentre as várias estratégias usadas para retardar a perda da “resistência vertical” (raça específica) em uma determinada variedade destacam-se: a piramidação de genes e a utilização de multilinhas. A resistência quantitativa, também tradicionalmente conhecida como “resistência horizontal” (raça não-específica) é causada pela expressão de alelos em *loci* específicos. A natureza poligênica da resistência horizontal é, portanto, mais dificilmente vencida pelo patógeno do que no caso de herança vertical (Gonçalves-Vidigal e Poletine, 1999).

Em virtude da extrema complexidade dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na interação planta-patógeno, a exploração do potencial natural de defesa das plantas ainda é limitada.

## **2.4 Percepção do patógeno**

Patógenos são um fato ubíquo no cotidiano das espécies vivas. Portanto, a habilidade de resistir à pressão de parasitismo constitui uma das chaves para o sucesso biológico (Taylor, 1998). Existem várias evidências de sistemas de reconhecimento de invasores conservados na natureza de plantas e

animais. Por exemplo, em um modelo gene-a-gene, genes de resistência a doença mediam o reconhecimento de componentes específicos, derivados de patógenos (produtos de genes de avirulência *Avr*), de um modo não divergente ao sistema imune animal de reconhecimento (Fluhr, 2001). Em adição, respostas sistêmicas de resistência R-mediadas, em *Arabidopsis*, são disparadas por uma via de transdução de sinal que inclui *NIM1/NPRI* (gene de imunidade não-induzível/não-expressor de PR proteínas) (Hammond-Kosack e Parker, 2003). A proteína *NIM1/NPRI* está relacionada a I $\kappa$ B, a qual regula respostas de resistência em ampla gama de espécies animais (Maleck e Lawton, 1998). As semelhanças não acabam aí. Convergência entre domínios em receptores vegetais e domínios *Toll* em drosófilas; produção de espécies ativas de oxigênio (ROS) e várias outras mudanças subseqüentes à invasão do patógeno (Taylor, 1998), salientam um traço ancestral das estratégias de defesa nas espécies vivas.

#### **2.4.1 Barreiras físicas**

A parede celular e a cutícula possuem importantes funções nos processos vegetais contra patógenos em potencial, uma vez que tais estruturas representam as primeiras barreiras de defesa a serem vencidas pelos patógenos, a fim de penetrarem e colonizarem a planta. Os vários polissacarídeos presentes na parede celular vegetal, tais como celulose, pectina e hemicelulose, podem servir como substratos para enzimas hidrolíticas, secretadas por vários patógenos (Tugayé et al., 2000). Os oligossacarídeos liberados após degradação proteolítica da parede celular podem agir como eliciadores, induzindo respostas de defesa na planta (Côté e Hahn, 1994). Paredes celulares vegetais e o fluido apoplástico que circunda cada célula também apresentam populações altamente complexas de proteínas, tendo muitas funções nos processos de defesa/resistência. Em muitos casos, o sucesso da planta em se defender contra o ataque de organismos invasores é determinado pela sua habilidade em apresentar uma rápida resposta



de defesa, muitas vezes localizada na parede celular/apoplasto (Tugayé et al., 2000).

Recentes experimentos têm mostrado que o fenômeno de morte celular programada, induzido por patógenos ou regulado por processos de desenvolvimento, é controlado por sinais originados na parede celular, envolvendo arabinogalactano-proteínas (Gao e Showalter, 1999). Ludwig e Tenhaken (2001) identificaram uma proteína rica em asparagina (“N-rich protein”, NPR), localizada na parede celular e fortemente induzida durante a reação de hipersensibilidade (HR) em soja, após infecção pela bactéria *P. syringae* pv. *glycinea*.

#### **2.4.2 Reconhecimento e resistência**

Resistência imune é encontrada em plantas portando gene ou genes de resistência. A resposta é bem descrita geneticamente através do modelo gene-a-gene, pelo qual uma proteína do patógeno, codificada por um gene de avirulência, é reconhecida por uma proteína R da planta, codificada por um gene de resistência. Tal reconhecimento ligante-receptor ativa uma cascata de mecanismos de defesa, incluindo reação hipersensitiva (HR), no qual células específicas do tecido, no sítio de infecção, morrem, limitando a disseminação do patógeno (De Wit, 2002). No entanto, a falta de evidências para interações diretas R-Avr, estimulou a proposição de novos modelos de percepção. Um modelo interessante é que proteínas R conferem reconhecimento apenas quando fatores Avr estejam complexados com seu alvo de virulência na célula hospedeira. Este modelo foi inicialmente proposto para explicar a função de uma proteína R, Prf, na sinalização AvrPto-Pto, mais tarde sendo referida como modelo “guarda” (Dangl e Jones, 2001). Neste modelo, Pto é considerado como o alvo de virulência de AvrPto, cujo reconhecimento é potencializado pela proteína R em uma função *guarda*, Prf (Van der Hoorn et al., 2002).

Várias características foram relatadas na arquitetura de um receptor produto de gene *R*. Receptores podem ser transmembrânicos ou citoplasmáticos. Alguns domínios já foram relatados em receptores ancorados na membrana plasmática, sendo bem conhecidos os LRR (*leucine-rich repeat*) e prováveis CC (*coiled coil*), além de sinais ECS (*endocytosis signal*) e seqüências C-terminal PEST (Pro-Glu-Ser-Thr). Em proteínas *R* citoplasmáticas destacam-se as formações a partir de domínios LRR-NBS (*Leucine rich repeat-nucleotide binding site*). Uma revisão relativamente atualizada da arquitetura de proteínas e genes *R* e *Avr* já identificados pode ser encontrada em Hammond-Kosack e Parker (2003).

Além de receptores específicos a produtos *Avr*, outros receptores podem estar associados a uma variedade de moléculas relacionadas a microrganismos, referidas como “eliciadores gerais”, que iniciam respostas de defesa em uma ampla gama de espécies de planta, de uma forma raça não-específica. Esses eliciadores incluem glicoproteínas, peptídeos, carboidratos e lipídios, e podem iniciar defesa comparável àquelas observadas em interações raça específica mediadas a gene *R*, em cultivares resistentes. Neste modelo, moléculas derivadas de superfície de patógeno (ou de interação planta-patógeno) estão associadas a padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs; *pathogen-associated molecular patterns*) (Heath, 2000; Nürnberger e Brunner, 2002). A busca por receptores baseados em PAMPs em plantas representa um bom escopo para trabalhos de controle envolvendo resistência durável (Hammond-Kosack e Parker, 2003).

### 2.4.3 Eliciadores

Várias classes de compostos estruturalmente distintos, como oligossacarídeos, moléculas lipofílicas, glicoproteínas e peptídeos têm sido demonstrados agir como sinais químicos que são percebidos pelas plantas e

induzem elementos envolvidos na resposta de defesa. Estas moléculas sinalizadoras, também referidas como eliciadores, podem ser classificadas como exógenas, quando oriundas do patógeno invasor, ou endógenas, quando provenientes da própria planta, em decorrência do ataque do patógeno (Côté e Hahn, 1994; Shibuya et al., 2001). Oligossacarídeos derivados da degradação de polissacarídeos presentes na parede celular de plantas ou fungos constituem uma classe de eliciadores bem caracterizados que, em alguns casos, podem induzir respostas de defesa em concentrações muito baixas (Shibuya et al., 2001).

Estudos desenvolvidos para avaliar a ação de eliciadores na indução de respostas de resistência a patógenos, em geral, utilizam suspensões celulares e cultura de tecidos vegetais. Esse sistema apresenta controle relativamente fácil em relação ao estágio de desenvolvimento, é homogêneo, e a aplicação direta de eliciadores resulta em uma exposição mais uniforme às células do que quando se utiliza tecidos mais complexos. Suspensões celulares não representam um sistema que ocorra naturalmente nem a heterogeneidade da estrutura celular presente em organismos multicelulares. Entretanto, estudos revelam que respostas de defesa em suspensões celulares, induzidas por eliciadores, são similares àquelas detectadas em tecidos vegetais intactos, induzidas por infecção fúngica (Batz et al., 1998).

A resistência induzida em plantas pode ser ativada por uma série de substâncias, entre as quais, o ácido salicílico e seus análogos figuram como algumas das mais importantes. O ácido salicílico (AS) foi o primeiro composto produzido por plantas a ter sua atividade como indutor de resistência sistêmica adquirida (SAR) demonstrada. Posteriormente, um análogo de AS, ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) foi o primeiro composto sintético a ativar SAR. Entretanto, tanto AS como INA são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas e, portanto, não possuem potencial para serem usados comercialmente como protetores de plantas. Outro análogo do AS, o éster S-metil do ácido

benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotiólico (ASM), um composto do grupo benzotiadiazole, comportou-se como ativador potente de SAR, possibilitando a proteção em condições de campo, contra um amplo espectro de patógenos em diversos cultivos (Gorlach et al., 1996). O ASM é, até o momento, o único indutor de SAR liberado para o uso comercial e acredita-se que seja o primeiro representante de uma nova geração de protetores de plantas eficientes na indução de resistência (Lyon e Newton, 1997).

No caso do cacau, alguns eliciadores de origem biótica têm sido utilizados eficazmente para induzir resistência a *Phytophthora* spp. (Ibarra et al., 1985) e ao vírus do inchamento dos râmulos ou CSSV (Hughes e Ollenu, 1994), na África. No Brasil, Resende e Bezerra (1996) relataram a indução de reação de hipersensibilidade em cacau inoculado com *C. pernicioso* proveniente de *Solanum stipulaceum*. Cavalcanti et al. (2000), relataram a indução de resistência em mudas de cacau a *Verticillium dahliae*, após uma pré-inoculação com *Crinipellis pernicioso* seguida pela remoção do meristema apical das mudas.

O desempenho de um eliciador certamente pode ser melhorado, ou mesmo estabilizado, se associado a outros indutores de resistência, ou mesmo a micronutrientes que podem funcionar como cofatores de várias enzimas envolvidas na síntese de compostos fenólicos ou terpenóides, comprovadamente importantes substâncias de defesa do cacau (Aguilar e Resende, 2000).

Estudos recentes têm focado o modo de ação bioquímico de produtos sintetizados em laboratório a partir do ácido salicílico, caracterizados como ativadores de resistência de plantas, principalmente o ASM (Moraes, 1998; Morris et al., 1998). Geralmente essa indução ocorre pela ativação de genes que codificam uma série de proteínas relacionadas à patogênese e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina, como fenilalanina amônia-liase

(PAL), cinamil-álcool desidrogenase (CAD), além de polifenoloxidasas e peroxidases (Reglinski et al., 1997).

#### **2.4.4 Custos**

De acordo com Purrington (2000), quando genótipos de planta possuem relativamente baixo rendimento na ausência de pestes, é assumido que sua performance baixa seja explicada pelo dreno energético envolvendo a sustentabilidade de defesa química e estrutural. A partir daí, várias ramificações de tipos de custos da resistência (e indução de resistência) podem ser abordadas: (i) Custos genéticos, são efeitos pleiotrópicos negativos, gerados pela herança de resistência, em detrimento da produtividade; (ii) Custos de alocação, resultam da alocação energética para resistência, em prejuízo da produtividade e capacidade reprodutiva; (iii) Custos de autotoxidez, derivados dos efeitos negativos da resistência no metabolismo da própria planta; (iv) Custos de oportunidade, propensão aumentada a desvios metabólicos e susceptibilidade a modificações externas. (Ex. absorção de nutrientes); (v) Custos ecológicos, resultam de efeitos negativos na interação da planta com o ambiente (Heil, 2002).

Em contrapartida ao melhoramento convencional de plantas, o número de genes de resistência clonados e plantas transformadas deverão crescer dramaticamente, posto que são muitas as vantagens potenciais de material transgênico no ganho e herdabilidade de resistência a herbicidas, insetos e microrganismos (Purrington, 2000).

#### **2.5 Proteínas relacionadas à patogênese**

A interação entre células vegetais e fungos fitopatogênicos desencadeia diferentes mecanismos de defesa pela planta por meio do reconhecimento de eliciadores de natureza biótica ou abiótica por receptores da célula vegetal. Estes mecanismos envolvem a produção de PR-proteínas (Davis et al., 1993).

As PR-P's (*Pathogenesis Related Proteins*) representam um grupo de proteínas bastante amplo, que engloba famílias de proteínas com características variadas (quitinases, glucanases, lisozimas, peroxidases, ribonucleases, proteínas transferidoras de lipídios, tioninas, permatinas, dentre outras), mas com o fato em comum de estarem todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese e serem geralmente utilizadas como marcadores de resistência sistêmica adquirida (SAR), apresentando dessa forma, potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção de plantas (Van Loon e Van Strien, 1999).

A maioria das PR-P's tem sua síntese ativada e/ou potencializada por indutores de resistência e conferem resistência de amplo espectro contra patógenos. A avaliação temporal da expressão de PR-P's em plantas tratadas com indutores químicos é um excelente indicativo do efeito protetor desses produtos e da durabilidade desse efeito. Portanto, a determinação temporal do aparecimento de PR-P's também possibilita estabelecer um cronograma para recomendação de aplicação de produtos indutores de resistência em plantas. A identificação e caracterização das proteínas de defesa do tipo PR-P's expressas e a determinação do padrão de expressão temporal destas após a indução de resistência, em comparação com o padrão normal de expressão de proteínas durante a patogênese, é um passo importante para a racionalização das estratégias de utilização de produtos indutores de resistência no controle de doenças de plantas.

Dentre as PR-proteínas conhecidas, o estudo das enzimas quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase tem especial interesse para a compreensão da interação entre plantas e fungos. As quitinases (EC 3.2.1.14) atuam hidrolisando a quitina que é um polímero de  $\beta$ -1,4-N-acetil-glicosamina constituinte da parede de ascomicetos (Chlan e Bourgeois, 2001), enquanto as  $\beta$ -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) atuam hidrolisando  $\beta$ -glucanos, oligossacarídeos com ligações do tipo

$\beta$ -1,6, e  $\beta$ -1,3-glicosil, também constituintes da parede celular de fungos (Chung et al., 1997).

Isoformas de quitinases e de  $\beta$ -1,3-glucanases diferem quanto a massa molecular, ponto isoelétrico e localização celular (Linthorst, 1991). Apenas isoformas específicas destas enzimas exibem atividade antifúngica (Rohini e Rao, 2001).

Vários agentes químicos estão direta ou indiretamente envolvidos com a regulação de genes relacionadas com a biossíntese de PR-proteínas. Genes que codificam para quitinases, por exemplo, têm sua expressão induzida por etileno (Boller et al., 1983), por ácido salicílico (Derckel et al., 1996) e por metil jasmonato (Sano et al., 1996). Enquanto que o acúmulo de  $\beta$ -1,3-glucanases requer etileno e é reduzida por ação de auxina e citocinina e ácido abscísico (Rezzonico et al., 1998).

O estudo da expressão dos genes para quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, bem como de peptídeos (tioninas) e outras proteínas com propriedades antifúngicas (proteínas transportadoras de lipídeos – LTPs, taumatinas, napinas e heveína), tem tornado possível a obtenção de plantas geneticamente modificadas, apresentando maior grau de resistência a uma determinada espécie de fungo (Chung et al., 1997; Melchers e Stuiver, 2000). A estratégia mais utilizada, no entanto, tem sido a expressão conjunta de genes para quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, em um fenômeno de sinergia.

As peroxidases (EC 1.11.1.7) de planta são glicoproteínas que contêm um grupamento *heme* em sua estrutura e possuem a função básica de catalisar a oxidação do peróxido de hidrogênio a partir de numerosas espécies de substratos orgânicos e inorgânicos, tais como citocromo *c*, nitrito, ascorbato, indol-aminas e outros (Zámocky et al., 2001). As peroxidases ocorrem em numerosas isoformas tanto em animais como em plantas. Metabolismo da auxina, biossíntese de *etileno*, formação de lignina, respiração, processos intermediados

por luz, defesa da planta contra patógenos, crescimento e senescência são alguns exemplos de processos fisiológicos nos quais existe a participação de peroxidases de plantas (Datta e Muthukrishnan, 1999).

Segundo Sreenivasulu et al. (1999), o aumento da produção de ROS é responsável pela peroxidação de membranas lipídicas e o grau de dano peroxidativo é controlado por um sistema enzimático antioxidativo composto por peroxidases. A atividade das peroxidases é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das principais funções da enzima (Cakmak e Horst, 1991). A oxidação dos álcoois hidroxicinâmicos, precursores imediatos da lignina, é catalisada por peroxidases, resultando na produção de radicais fenoxi-mesoméricos que reagem espontaneamente durante a deposição de lignina na parede celular (Peixoto, 1998). As maiores atividades de peroxidases ácidas são detectadas na parede celular, sendo que a parede primária representa a matriz sobre a qual ocorre a lignificação (Gaspar et al. 1985).

A fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5) é uma importante enzima, componente indireto do mecanismo de defesa da planta. Esta enzima é responsável pela conversão da fenilalanina, proveniente da rota do ácido shikímico, em ácido *trans*-cinâmico, o qual representa um primeiro fenilpropanóide-chave nas vias de síntese de lignina e ácido salicílico (Sarma et al., 1998; El-Shora, 2002). Além de fitoalexinas, a PAL participa, então, da síntese de compostos fenólicos que estão diretamente envolvidos na defesa da planta contra o ataque de patógenos, podendo participar tanto em defesa local, quanto na defesa sistêmica vegetal (Hammond-Kosack e Jones, 2000).

Oxidases de polifenóis (PPO) são conhecidas também como oxidases de catecol, fenolases, ou o-difenol oxidoreductase (EC 1.10.3.1). Esta glicoproteína catalisa a oxidação de o-difenóis a o-diquinonas, assim como a o-hidroxilação de monofenóis. Oxidases de polifenóis normalmente possuem uma taxa muito alta



de conversão de difenóis para monofenóis (Vaughn e Duke, 1984). Quanto a enzima possui uma característica p-difenol dioxidoreductase, é conhecida também como lacase. A capacidade desta enzima em catalisar a produção de quinonas tóxicas a insetos e patógenos fez os pesquisadores acreditarem estar esta enzima envolvida em processos de defesa contra microrganismos e parasitas, a partir de rompimento de tecido celular (Vaughn e Duke, 1984). Evidências recentes apontam as lacases de p-difenóis como funcionais na polimerização de monômeros de lignina, dividindo esta função com as peroxidases de fenóis (Mayer e Staples, 2002).

Tanto a PAL quanto a PPO não são classificadas como sendo PR proteínas, em sentido conceitual. No entanto, essas enzimas estão bem relatadas em funções relacionadas à defesa de planta contra microrganismos e insetos.

## **2.6 O papel paradoxal do oxigênio na interação planta-patógeno**

Uma das grandes contradições da realização da vida reside no fato de que a molécula que sustenta a bioquímica dos seres aeróbicos, o oxigênio, não apenas é fundamentalmente essencial para o metabolismo energético e a respiração, mas também é causa de muitas doenças e condições degenerativas (Marx, 1985; Scandalios, 1993). Em humanos, são conhecidos exemplos de desordem metabólica envolvendo formas reduzidas de oxigênio, tais como câncer, artrite e disfunções nervosas. Essas formas de oxigênio também são responsáveis por disfunções em plantas cultivadas induzidas por estresses diversos (Maxwell et al., 1999).

### **2.6.1 Reações de hipersensibilidade (HR)**

Sistemas vivos desenvolveram mecanismos de defesa que utilizam espécies reativas de oxigênio (ROS). Destas espécies, a formação de peróxido de hidrogênio, superóxido e óxido nítrico são amplamente encontrados em

metabolismo de plantas. Geração de ROS é considerada um evento inicial que influencia a interação planta-patógeno, recebendo atribuições como: ataque oxidativo direto sobre o patógeno, envolvimento na bioquímica de reforço de parede celular, promoção de morte celular programada (mediada a ROS) em fenômeno HR e indução de expressão de genes (Bolwell, 1999).

A resposta hipersensitiva caracteriza a formação de lesões necróticas no sítio de infecção, acabando por dificultar o espalhamento do microrganismo invasor no tecido do hospedeiro (Richael e Gilchrist, 1999). A HR já foi evidenciada em respostas de planta a vírus, bactérias, fungos, nematóides e mesmo insetos (De Wit, 1997). Similarmente ao que é observado na ação de macrófagos durante a resposta imune de animais, um dos eventos iniciais da HR é a acumulação de intermediários ROS e óxido nítrico (NO) (Delledone et al., 2002). A síntese dessas espécies ocorre principalmente pela ativação de NADPH e NADH oxidases da membrana plasmática (Bolwell, 1999). Foi evidenciado que o balanço  $H_2O_2/NO$  é necessário para o disparo de morte celular programada (PCD), que por sua vez é a base da HR mediada a ROS (Neill et al., 2002). Contudo, existem evidências de que PCD de HRs também pode acontecer sem a participação direta de ROS, mas sim pela expressão de proteases cisteínicas ou outros mecanismos similares à apoptose (Bolwell, 1999).

De qualquer forma ROS podem receber uma atribuição favorável, em um contexto de defesa inicial envolvendo principalmente resistência raça específica. O peróxido de hidrogênio, por exemplo, participa positivamente de várias atribuições metabólicas na fisiologia da planta: sinalização sistêmica, processos de PCD mediados a  $H_2O_2$ , fechamento estomático mediado por  $H_2O_2$  e ABA, metabolismo do gravitropismo radicular, sinalização a *downstream* e expressão de genes (Neill et al., 2002). No entanto, a dinâmica altamente regulada de ROS, em especial do  $H_2O_2$ , pode ser desbalanceada por forças

estressantes diversas, influenciando a distribuição endógena dessas espécies reativas e motivando a injúria oxidativa.

### 2.6.2 Estresse oxidativo

O radical superóxido ( $O_2^-$ ) pode agir como oxidante e como redutor: pode oxidar enxofre, ácido ascórbico ou NADPH; pode reduzir o citocromo *c* e íons metálicos. A reação de dismutação levando à formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (Grant e Loake, 2000; Breusegem et al., 2001). Em sua forma protonada ( $pK_a = 4,8$ ) o superóxido pode originar um radical peridroxila ( $OOH^{\cdot}$ ) que é um forte oxidante, mas sua relevância biológica é provavelmente menor devido à sua baixa concentração em pH fisiológico (Gebicki e Bielsi, 1981). A redução univalente do superóxido produz peróxido de hidrogênio que não é um radical livre devido a todos seus elétrons estarem emparelhados. Foyer e Noctor (2000) relatam que o peróxido de hidrogênio é notável devido a sua permeabilidade entre as membranas, por isso mesmo não consegue ser compartimentalizado pela célula.

A redução do oxigênio à forma de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila é o mecanismo principal de ativação de oxigênio na maioria dos sistemas biológicos. Contudo, em plantas fotossintéticas, a formação de oxigênio ativo pelos fotossistemas tem importância fundamental. O oxigênio ativado é frequentemente produzido como um componente de um metabolismo que permite reações químicas complexas, tais como a oxidação dos xenobióticos ou a polimerização da lignina (Scandalios, 1993; Peixoto, 1998; Dionísio-Sese e Tobita, 1998; Datta e Muthukrishnan, 1999). No entanto, em outras situações, o oxigênio ativado é produzido por meio de distúrbios enzimáticos ou em sistemas de transporte de elétrons, como resultado de perturbações no metabolismo causadas por estresse químico ou ambiental (Zhu, 2001). Em decorrência disso,

surge um desbalanço oxidativo, o qual, por sua vez, caracteriza o estresse oxidativo, manifestando-se no aumento do fenômeno de degradação oxidativa de macromoléculas constituintes da célula, perturbando o funcionamento e, muitas vezes, levando ao colapso celular.

### **2.6.3 Mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos**

De acordo com Del Rio et al., (1998) e Polle (2001), o ciclo do ascorbato-glutationa (Halliwell-Asada) é uma via eficiente de células de planta que dispõem de  $H_2O_2$  em determinados compartimentos onde este metabólito é produzido e não existe catalase presente. Este ciclo faz uso dos antioxidantes não enzimáticos como o ascorbato e a glutatona em uma série de reações catalisadas por quatro enzimas antioxidativas, e está bem demonstrado em cloroplastos, citossol e mitocôndrias de nódulos radiculares (Polle, 2001). Em peroxissomos e mitocôndrias purificadas a partir de folhas de ervilha, a presença de todas as enzimas do ciclo já foi relatada (Jiménez et al., 1997). As quatro enzimas, peroxidase de ascorbato (APX), redutase de monodeidroascorbato (MDHAR), redutase de deidroascorbato (DHAR) e redutase de glutatona (GR) foram evidenciadas em peroxissomos. Da mesma forma, em peroxissomos e mitocôndrias, a presença de ascorbato e glutatona e suas formas oxidadas, deidroascorbato e GSSH (dois resíduos de glutatona, um tripeptídeo, ligados por ponte dissulfeto), respectivamente, foram identificados por HPLC (Jiménez et al., 1997).

Peroxidases de ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) pertencem a uma família de enzimas que eliminam peróxido de hidrogênio às custas de ascorbato, formado durante os processos bioquímicos normais ou durante a imposição de estresses bióticos à planta, como infecção por patógenos (Burhennie e Gregersen, 2000; Venisse et al., 2002), ou estresses abióticos, como toxidez química e

choque osmótico causado por salinidade ou restrição hídrica (Peixoto et al., 1999). APXs atuam catalisando a reação:



Uma característica importante desta enzima é a alta especificidade para o ácido ascórbico como doador de elétrons (Nakano e Asada, 1981). O ascorbato oxidado na reação de eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalisada pelas POXs é regenerado através do ciclo do ascorbato-glutationa (Jiménez et al., 1997). Atividade de APXs pode estar correlacionadas positivamente ao mecanismo de defesa da planta, dada sua capacidade de atuar em um mecanismo de alívio oxidativo (Mittler e Zilinskas, 1993; Peixoto et al., 1999).

Dismutases de superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) são amplamente conhecidas por catalisar a dismutação de superóxido, na formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio (Grant e Loake, 2000; Breusegem et al., 2001).



Evidenciada em praticamente todos os organismos aeróbios e na maioria dos compartimentos subcelulares que produzem oxigênio ativado, senão todos, tem-se assumido que a SOD possui uma função central na defesa do organismo contra estresse oxidativo (Scandalios, 1993; Borsani et al., 2001; Martinez et al., 2001; Polle, 2001).

Existem três tipos distintos de SOD, classificadas com base em seu cofator metálico: cobre/zinco (Cu/Zn – SOD); manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD), sendo os três tipos isoenzimas (Bannister et al., 1987). Essas isoenzimas podem ser separadas por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida e sua atividade detectada por revelação negativa com base na sua sensibilidade

ao KCN e/ou ao superóxido. Existem distinções entre as isoenzimas, como, por exemplo, a afinidade com substratos: a Mn-SOD é resistente ao KCN e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que a Cu/Zn-SOD é sensível a ambas. Fe-SOD é resistente ao KCN e sensível ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Também se distinguem pela distribuição subcelular. Peroxissomos e glioxissomos mostraram conter atividade Cu/Zn-SOD e Mn-SOD (Del Rio et al., 1998; Hernández et al., 2001). Foi encontrada em apoplastos de folhas de *Hordeum vulgare* e *Avena sativa* presença não apenas de atividade SOD, mas também CAT e enzimas antioxidativas do ciclo do ascorbato-glutationa (Hernández et al., 2001).

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma enzima contendo um grupamento *heme* em sua estrutura que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Zámocky et al., 2001). A enzima é encontrada em todos os eucariotos aeróbios e é muito importante na remoção do peróxido de hidrogênio produzido nos peroxissomos e glioxissomos pelas oxidases envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, nas reações do glioxilato (fotorrespiração) e no catabolismo das purinas (Breusegem et al., 2001). A catalase foi uma das primeiras enzimas a ser isolada em seu estado altamente purificado. Todas as formas de catalase são tetraméricas com massas moleculares que podem exceder 220KDa. Múltiplas formas de catalase têm sido descritas em muitas espécies de plantas (Peixoto, 1998). Breusegem et al. (2001) sugerem serem as catalases as principais enzimas de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas.

A catalase pode utilizar o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tanto como um aceptor como um doador de elétrons, resultando oxigênio e água como produtos finais. As catalases podem ser inibidas por ácido salicílico (Dat et al., 1998) e luz, ou também por degradação (Peixoto, 1998).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAREZ, F. V.; RIZZINI, C. M.; PEREIRA, C. **Botânica: Angiospermae**. 2. ed. Âmbito Cultural Edições, 1994.

AGUILAR, M. A. G.; RESENDE, M. L. V. Bases bioquímicas e fisiológicas da resistência a doenças. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacauero**. Goiânia: FUNAPE/UFG, 2001. p. 325-359.

AL-DAHMANI, J. H.; ABBASI, P. A.; MILLER, S. A.; HOITINK, H. A. J. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 8, p. 913-919, Aug. 2003.

BANNISTER, J. V.; BANNISTER, W. H. AND ROTILS; G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. **CRC Critical Review in Biochemistry**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 110-180, 1987.

BARBARA, D. J.; CLEWES, E. Plant Pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 4, p. 297-305, 2003.

BATZ, O.; LOGEMANN, E.; REINOLD, S.; HAHLBROCK, K. Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 379, n. 8/9, p. 1127-1135, 1998.

BOLLER, T.; GEHRI, A. ; MAUCH, R.; VOGELI, U. Chitinase in bean leaves induction by ethylen purification, properties and possible functions. **Planta**, Berlin, v. 157, n. 1, p. 22-31, 1983.

BOLWELL, G. P. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, n. 4, p. 287-294, Aug. 1999.

BORSANI, O.; DIAZ, P.; AGIUS, M. F.; VALPUESTA, V.; MONZA, J. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. **Plant Science**, Clare, v. 161, n. 4, p. 757-763, Sept. 2001.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 161, n. 3, p. 405-414, Aug. 2001.

BUHEL, A. S.; LINTHORST, H. J. M. PR1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Ed.). **Pathogenesis-related protein**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 21-47.

BURHENNE, K.; GREGERSEN, P. L. Up-regulation of the ascorbate-dependent antioxidative system in barley leaves during powdery mildew infection. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, n. 5, p. 303-314, 2000.

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V.; ANDRADE, G. C. G. Indução de resistência em plantas de cacauero a *Verticillium dahliae* por *Crinipellis pernicioso*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 23., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas, 2000. Resumo 73.

CEAGESP, Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. MAA. **Boletim CEAGESP: Jornal dos entrepostos**. [http://www.jornalentrepосто.com.br/janeiro\\_2005/mercado\\_acao.htm](http://www.jornalentrepосто.com.br/janeiro_2005/mercado_acao.htm) e <http://www.ceagesp.gov.br/internet>. 2005.

CHLAN, C. A.; BOURGEOIS, R. P. Class I chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*): characterization, expression and purification. **Plant Science**, Clare, v. 161, p. 143-154, June 2001.

CHUNG, R. P. T.; NEUMANN, G. M.; POLYA, G. M. Purification and characterization of basic proteins with in vitro antifungal activity from seeds of cotton, *Gossypium hirsutum*. **Plant Science**, Cclare, v. 127, n. 1, p. 1-16, Aug. 1997

CAKMAK, I.; HORST, J. H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 3, p. 463-468, Nov. 1991.

CORDEIRO, M. C. R.; SÁ, M. F. G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlandia, v. 2, n. 10, p. 34-40, set./out. 1999.



- CÔTÉ, F.; HAHN, M. G. Oligosaccharins: structures and signal transduction. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 5, p. 1379-1411, Dec. 1994.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. C. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, n. 6839, p. 826-833, June 2001.
- DAT, J. F.; LOPEZ-DELGADO, H.; FOYER, C. H.; SCOTT, I. M. Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 4, p. 1351-1357, Apr. 1998.
- DAVIS, D.; MERIDA, J.; LEGENDRE, L.; LOW, P. S.; HEINSTEIN, P. Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 607-611, Mar. 1993.
- DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-related proteins in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1999. 291 p.
- DELLEDONE, M.; MURGIA, I.; EDERLE, D.; SBICEGO, P. F.; BIONDANI, A.; POLVERATI, A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease resistance response. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 6/8, p. 605-610, June/Aug. 2002.
- DEL RIO, L. A.; PASTORI, G. M.; PALMA, J. M.; SAUDALIO, L. M.; SAVILLA, F.; CORPAS, F. J.; JUMENEZ, A.; LOPEZ-HUERTAS, E.; HERNANDEZ, J. A. The activated oxygen role of Peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, Oxford, v. 116, n. 4, p. 1195-1200, Apr. 1998.
- DERCKEL, J.; LEGENDRE, L.; AUDRA, J. C.; HAYE, B.; LAMBERT, B. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): Five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. **Plant Science**, Clare, v. 119, n. 1/2, p. 31-37, Sept. 1996.
- DE WIT, P. J. G. M. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 452-458, Dec. 1997.
- DE WIT, P. J. G. M. On guard. **Nature**, London, v. 416, p. 801-803, 2002.
- DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, Clare, v. 135, n. 1, p. 1-9, June 1998.

EL-SHORA, H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from narrow cotyledons. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 1, p. 1-7, 2002.

FOYER C. H.; NOCTOR G. Tansley Review 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, Cambridge, v. 146, n. 3, p. 359-388, Jan. 2000.

FLUHR, R. Sentinels of disease: plant resistance genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 4, p. 1367-1374, Dec. 2001.

GAO, M. G.; SHOWALTER, A. M. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan-protein involvement. **Plant Journal**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 321-331, Aug. 1999.

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F. J.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 64, n. 3, p. 418-423, Mar. 1985.

GEBICKI, J. M.; BIELSKI, B. H. J. Comparison of the capacities of the perhydroxyl and superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v. 103, n. 23, p. 7020-7022, 1981.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; POLETINE, J. P. Resistência a doenças. In: DEONISIO, ; MONTALVAN, R. (Ed.). **Melhoramento genético de plantas.**— Londrina: Ed. UEL, 1999. p. 423-464.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KANAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. -H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease reduction in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, Apr. 1996.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 1, p. 21-29, Sept. 2000.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to Plant Pathogenesis. In: BUCHANAN, B.; GUISSSE, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2000. p. 1102-1156.

HAMMOND-KOSACK, K.; PARKER, J. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 177-193, 2003

HEATH M. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 315-319, 2000.

HEIL, M. Ecological costs of induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2002.

HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 3, p. 817-831, Nov. 2001.

HUGHES, J. A.; OLLENU, L. A. A. Mild strain protection of cocoa in Ghana against cocoa swollen shoot virus: a review. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 442-457, June 1994.

IBARRA J.; BLAHA G.; HERAIL C. Contribution à la mise en évidence de substances du type phytoalexine chez *Theobroma cacao*, *T. grandiflora* et *T. bicolor* au cours de l'infection par *Phytophthora palmivora* et *P. megakarya* ou après induction par des agents abiotiques. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 10., 1984. Lomé, Togo. **Proceedings...** Lomé, Togo, 1985. p. 303-308.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J. A.; DEL RIO, L. A.; SEVILLA, F. Evidence of the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 1, p. 275-284, May 1997.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 235-280, 1997.

LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Review of Plant Science**, Boca Raton, v. 10, n. 2, p. 123-150, 1991.

- LOON, L. C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Ed.). **Pathogenesis-related protein**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 1-19.
- LUDWIG, A. A.; TENHAKEN, R. A new cell wall located N-rich proteins is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 3, p. 323-336, Mar. 2001.
- LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 636-641, Dec. 1997.
- MALECK, K.; LAWTON, K. Plant strategies for resistance to pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 9, n. 2, p. 208-213, Apr. 1998.
- MARTIN, H. L.; HAMILTON, V. A.; KOPITTKER, R. A. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 9, p. 921-924, 2004.
- MARTINEZ, C. A.; LOUREIRO, M. E.; OLIVA, M. A.; MAESTRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative stress and water stress. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 3, p. 505-515, Feb. 2001.
- MARX, J. L. Oxygen free radicals linked to many diseases. **Science**, Washington, v. 235, n. 4788, p. 529-531, Jan. 1985.
- MAXWELL, D. P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 96, n. 14, p. 8271-8276, July 1999.
- MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 551-565, July 2002.
- MELCHERS, L. S.; STUIVER, M. H. Novel genes for disease-resistance breeding. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 2, p. 147-152, Apr. 2000.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 212, n. 2, p. 540-546, Aug. 1993.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284, 1998.

MORRIS, S. W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARRETT, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C. C.; FREDERIKSEN, R. A.; BHANDHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced resistance responses in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 7, p. 643-658, July 1998.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 388-395, Aug. 2002.

NOËL, G. M. A. M.; MADRID, E. A.; BOTTINI, R.; LAMATTINA, L. Indole acetic attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 9, p. 815-823, Sept. 2001.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate Immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 318-324, Aug. 2002.

OBRADOVIC, A.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; BALOGH, B.; OLSON, S. M. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar application of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 7, p. 736-740, July 2004.

OELOFSE, D.; DUBERY, I. A. Induction of defense responses in cultured tobacco cells by elicitors from *Phytophthora nicotianae*. **International Journal Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 295-301, Mar. 1996.

OKUSHIMA, Y.; KOIZUMI, N.; KUSANO, T.; SANO, H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-

related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, n. 3, p. 479-488, Feb. 2000.

PACCHIOLI, D. Cocoa Futures. **Research Pennstate**, v. 22, n. 2, p. 2001.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos Bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

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

PEIXOTO, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com tolerância diferencial ao alumínio**. 1998. 95 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, dez. 1999.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**. v.126:445-462. 2001.

POMAR, F.; NOVO, M.; BERNAL, M. A.; MERINO, F.; BARCELÓ, A. R. Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 163, n. 1, p. 111-123, July 2004.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao Witches Broom: Biology, Epidemiology, Management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

PURRINGTON, C. B. Costs of resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 305-308, Aug. 2000.

REGLINSKI, T.; POOLE, P. R.; WHITAKER, G.; HOYTE, S. M. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit leaves. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 716-721, Oct. 1997.

RESENDE, M. L. V.; BEZERRA, J. L. Crinipellis perniciosa de um novo hospedeiro (*Solanum stipulaceum*) induzindo reação de hipersensibilidade em *Theobroma cacao*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 405, ago. 1996. Resumo.

REZZONICO, E.; FLURY, N.; MEINS, F.; BEFFA, R. Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related  $\beta$ -1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 2, p. 585-592, June 1998.

RICHAEL, C.; GILCHRIST, D. The hypersensitive response: a case of hold or fold? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 5-12, July 1999.

RIDE, J. P. Cell walls and other structural barriers in defence. **Biochemical Plant Pathology**, p. 215-235, 1983.

ROHINI, V. K.; RAO, K. S. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 5, p. 889-898, Apr. 2001.

SADRAS, V. O.; QUIROZ, F.; ECHARTE L.; ESCANDE, A.; PEREYRA, V. R. Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 5, p. 1007-1015, Nov. 2000.

SANO, H.; SEO, S.; KOIZUMI, N.; NIKI, T.; IWAMURA, H.; OHASI, Y. The regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acid in mechanically wounded tobacco plants. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 37, n. 6, p. 762-769, Sept. 1996.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, Dec. 1998.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 7-12, 1993.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharides signalling for defences responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 223-233, 2001.

SWAIN, T. Secondary compounds as protective agents. **Annual. Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, p. 479-501, 1977.

SREENIVASULU, N.; RAMAGULUS, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PARAKASH, H. S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H. S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. **Plant Science**, Clare, v. 141, n. 1, p. 1-9, June 1999.

TAYLOR, C. B. Defense responses in plants and animals – more of the same. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 6, p. 873-876, June 1998.

TUGAYÉ, M. T. E.; BOUDART, G.; BERNARD, D. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 157-163, Jan./Feb. 2000.

UKNES, S.; VERNOOIJ, B.; MORRIS, S.; CHANDLER, D.; STEINER, H.; SPECKER, N.; HUNT, M.; NEUENSCHWANDER, U.; LAWTON, K.; STARRETT, M.; FRIEDRICH, L.; WEIMANN, K.; NEGROTTO, D.; GORLACH, J.; LANAHAN, M.; SALMERON, J.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistant crops. **New Phytologist**, Cambridge, v. 133, n. 1, p. 3-10, May 1996.

VAN DER HOORN, R. A. L.; DE WIT, P. J. G. M.; JOOSTEN, M. H. A. J. Balancing selection favors guarding resistance proteins. **Trends In Plant Science**, London, v. 7, n. 2, p. 67-71, Feb. 2002.

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

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 60, n. 1, p. 106-112, 1984.



VENISSE, J. S.; MALNOY, M.; FAIZE, M.; PAULIN, J. P.; BRISSET, M. N. Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 12, p. 1204-1212, Dec. 2002.

WEI, Y.; ZHANG, Z.; ANDERSEN, C. H.; SCHMELZER, E.; GERGERSEN, P. L.; COLLINGE, D. B.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defense response of barley attacked by the powdery mildew fungus. **Plant Molecular Biology**, London, v. 36, p. 101-112, 1998.

ZÁMOCKY, M.; REGELSBERGER, G.; JAKOPITSCH, C.; OBINGER, C. The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 492, n. 3, p. 177-182, Mar. 2001.

ZHANG, Z.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. **Plant Journal**, Dordrecht, v. 8, n. 1/2, p. 139-145, 1995.

ZHU, J-K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 401-406, 2001.

## **CAPÍTULO 2**

### **EFICÁCIA COMPARATIVA DE QUÍMICOS E FORMULAÇÕES NATURAIS NAS REPOSTAS DE DEFESA DO TOMATEIRO CONTRA A MANCHA FOLIAR BACTERIANA**

## 1 RESUMO

CAVALCANTI, F. R. Eficácia comparativa de químicos e formulações naturais nas respostas de defesa do tomateiro contra a mancha foliar bacteriana. In: \_\_\_\_\_. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos**. 2005. Cap. 2, p. 37-91. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Foi avaliada a eficiência de uma suspensão de quitosana ('20% MCp'), bem como um filtrado aquoso ('30% CPA') provenientes de micélio de *Crinipellis pernicioso*, e extratos aquosos a quente ('30% VLA') e a frio ('30% VLAf') de tecido necrótico de ramos de lobeira, *S. lycocarpum*, infectados por *C. pernicioso*, bem como seu tecido sadio ('30% FLO'), na proteção de plantas de tomate infectado por *Xanthomonas vesicatoria*. As plantas foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil (0,2 mg ASM mL<sup>-1</sup>); com uma formulação proveniente de polpa cítrica, conhecida como Ecolife® (5 mL L<sup>-1</sup>); silicato de potássio (1,5 mL L<sup>-1</sup>); um extrato aquoso a quente de folhas de café infectadas por *Hemileia vastatrix*; e uma fração parcialmente deacetilada de quitina, a partir de carapaça de caranguejo (SIGMA). Em experimento de quantificação de doença, pulverização prévia dos extratos testados causou redução na severidade da mancha foliar, sendo que '20% MCp', '30% VLAf', Ecolife® e '30% VLA' mostraram respostas significativas, atingindo 87%, 86%, 80% e 64% da performance do ASM, respectivamente. Mudança do padrão de atividade de peroxidases (POX) e oxidases de polifenóis (PPO), iniciadas após poucas horas das pulverizações, foi evidente, com os valores mantendo-se elevados até aproximadamente 9 dias. Simultaneamente à queda na atividade de fenilalanina amônia liases (PAL) 3 dias após as pulverizações (DAP), plantas tratadas mostraram significativo aumento na deposição de lignina e redução nos valores de fenóis totais, aos 9 e 12 DAP. Exposição das plantas aos tratamentos também acarretou aumento na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (QUI), iniciadas após as primeiras horas, mantendo-se em níveis mais altos que o controle até 9 e 12 DAP. Neste trabalho, foi sugerido que o aumento nas atividades de enzimas relacionadas à patogênese e deposição induzida de lignina poderiam estar associados à redução na severidade da mancha foliar, em plantas pulverizadas previamente com os extratos naturais.

\* Comitê de Orientação: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAVALCANTI, F. R. Comparative efficacy of chemicals and natural formulations on tomato defence responses against bacterial leaf spot. In: \_\_\_\_\_. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos.** 2005. Cap. 2, p. 37-91. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

The efficacy to plant protection of chitosan suspension ('20% MCp') as well as aqueous filtrate ('30% CPA') from *Crinipellis pernicioso* mycelium, and heat aqueous extracts from flour of dry healthy ('30% FLO') or infected necrotic tissue ('30% VLA') from branches of 'lobeira' (*Solanum lycocarpum*) bush was evaluated in tomato against 4-day subsequent challenge with a virulent *Xanthomonas vesicatoria* strain. The potential of chemicals and natural treatments to reduce bacterial leaf spot in susceptible tomato plants also was investigated. Plants were sprayed with acibenzolar-S-methyl (0.2 mg ASM/mL); Ecolife® (5 mL/L); potassium silicate (1.5 mL/L); an aqueous extract from rusted coffee leaves and a partially deacetylated fraction of chitin from crab shells. In disease assessment experiment, foliar pulverization of extracts caused some kind of results in terms of decrease of lesion severity, however only '20% MCp' and '30% VLA' showed significant responses reaching 87 and 63% of ASM performance on protection against Xv leaf spot, respectively. ASM and Ecolife® treatments showed best results, reaching 49,3% and 39,2% of performance on protection against Xv leaf spot, respectively. Expression of resistance induced by natural extracts was patent on increase of peroxidases (POX) and polyphenol oxidases (PPO) started just in early hours after pulverizations carry on until approximately 9 and 12 days. Aside to slight decrease of phenylalanine ammonia-lyase activity PAL 3 days afterwards, '20% MCp' and '30% VLA' treated plants showed significant increase on lignin deposition and decline of total phenolic compounds at 9 and 12 days after treatment. Expression of resistance induced by studied treatments was evidenced also on increase of  $\beta$ -1,3- glucanases (GLU) and chitinases (CHI) activities, in early hours after pulverizations keep up afterwards until 9 and 12 days. In this work, we suppose that increased POX might result in lignification and thus be associated with defense against Xv leaf spot, so as GLU and CHI activities.

\* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Adviser); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

O Tomate, *Lycopersicon esculentum*, é uma planta grandemente afetada por *Xanthomonas vesicatoria*, o agente bacteriano da mancha foliar. Redução de produtividade causada pela mancha foliar bacteriana é freqüentemente encontrada no sudeste do Brasil, em áreas de produção mais úmidas, sendo mais uma limitação em uma cultura já problemática. Interações planta-patógeno são mediadas por uma rede complexa de eventos moleculares e citológicos que eventualmente determinam o grau de susceptibilidade e resistência (Benhamou e Bélanger, 1998). As plantas possuem muitas barreiras pré-formadas, mas também podem ativar resistência de não hospedeiro, e resistências raça específica e raça não específica. Ativação de respostas locais podem também induzir resistência sistêmica, que protegem tecidos contra o subsequente ataque de ampla variedade de patógenos (Hammond-Kosack e Parker, 2003). A resistência induzida é persistente e não específica para um patógeno. Uma das categorias de resistência induzida (RI) é a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e desempenha uma função central na resistência à doença. SAR desenvolve-se tanto localmente quanto sistemicamente em resposta ao ataque de um patógeno e é associada com um aumento na atividade de enzimas, como quitinases (CHI, EC 3.2.1.14),  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.6), peroxidases (POX; EC 1.11.1.7), outras proteínas relacionadas à patogênese, acúmulo de fitoalexinas e deposição de lignina (Durrant e Dong, 2004). Além disso, o reforço de parede celular com deposição de derivados de lignina (Anterola e Lewis, 2002) e aumento da atividade de enzimas envolvidas em vias metabólicas, como fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5) (Hé et al., 2002) e oxidases de polifenóis (PPO, 1.10.3.2) (Mayer e Staples, 2002) podem

naturalmente estar presentes em um evento de SAR mutuamente ao acúmulo de ácido salicílico (Durrant e Dong, 2004).

Avanços na pesquisa têm aumentado a noção de que fatores exógenos poderiam afetar substancialmente a fisiologia do hospedeiro, levando a um contra-ataque rápido e coordenado em plantas expressando susceptibilidade. Compostos sintéticos, como o ASM (éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico), parecem atuar similarmente ao ácido salicílico e também induz SAR contra bactérias, fungos e vírus (Cole, 1999; Anfoka, 2000; Resende et al., 2002). Uma ativação similar do sistema de defesa de planta tem ocorrido mediante aplicação exógena de quitosana, ou certos químicos, tais como, ácido 2,6 dicloro isonicotínico (INA); ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA) e metil-jasmonato (MeJA) (Hwang et al., 1997; Benhamou e Bélanger, 1998). Além de químicos e eliciadores específicos, uma variedade de trabalhos tem demonstrado que plantas reconhecem compostos derivados da superfície celular de microrganismos, o qual induzem respostas de defesa em ambas plantas hospedeiras e não hospedeiras. Estes incluem, peptídeos, carboidratos, glicoproteínas e lipídios (Nürnberg e Brunner, 2002). Além disso, PR-proteínas e poligalactoranases de patógenos podem hidrolisar substratos da parede celular do patógeno ou hospedeiro, causando eliciação indireta pela liberação de produtos eliciadores não específicos, no ambiente apoplástico (Van Loon, 1997). Há relatos do controle satisfatório de doenças de plantas com o uso de silicato de potássio. Chérif e Bélanger (1992), verificaram a redução da podridão em raízes causada por *Pythium ultimum* em pepino, sem no entanto confirmar o aumento de produtividade. Da mesma forma, pulverizações de silicato de potássio aumentaram o período de latência de *Sphaeroteca fuliginea*, retardando a formação de lesões em melão almiscarado (Menzies et al., 1992).

Neste trabalho, foi investigada a eficiência de químicos, de formulação natural (comercialmente conhecida como Ecolife®) e de extratos naturais na

proteção do tomate contra a mancha foliar causada por *Xanthomonas vesicatoria*, através de pulverização foliar, antes da inoculação com o patógeno.

Os Tratamentos experimentais foram ASM; Ecolife® (uma formulação natural derivada de polpa cítrica); silicato de potássio ( $K_2SiO_3$ ); quitosana extraída de carapaça de caranguejo (SIGMA) e de micélio de *Crinipellis pernicioso*; extratos aquosos de tecido sadio e necrótico de *Solanum lycocarpum*, infectado por *C. pernicioso*, e de tecido foliar de cafeeiro densamente infectado por *Hemileia vastatrix*. Na composição dos extratos, foi hipotetizada a obtenção de uma suspensão heterogênea de eliciadores, tais como derivados de quitina de biomassa fúngica e partículas constituintes de tecido doente, incluindo numerosas macromoléculas solubilizadas. Adicionalmente, marcadores fisiológicos de indução de resistência, tais como enzimas relacionadas à defesa (PPO e PAL), PR-proteínas (POX, GLU e CHI), deposição de lignina, fenólicos totais e pigmentos fotossintéticos foram avaliados nos tratamentos mais eficientes para redução de progresso de doença.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal e condições de crescimento

Em experimentos de proteção de planta, conduzidos em casa de vegetação, plântulas de tomateiro cv. Santa Kruz Kada, susceptíveis à mancha foliar causada por *Xanthomonas versicatoria* (Xv), foram mantidas em recipientes de 3L em substrato composto de areia, matéria orgânica seca e vermiculita (2:1:1). O experimento, neste caso, foi delineado em DBC, com 5 blocos, sendo considerado como unidade experimental, 1 recipiente contendo 4 plantas.

Para experimentos de coleta de tecido foliar fresco, sementes de tomate, cv. Santa Cruz Kada, foram imersas em EtOH 1% v/v e hipoclorito de sódio 0,1% v/v, por 1 minuto, e então lavadas com água destilada e germinadas em recipientes de 400mL, contendo areia textura média exaustivamente lavada e esterilizada. Após emergência, as plântulas foram regadas diariamente com 1/10 da solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com média de temperatura dia/noite de 31/24°C, umidade relativa de 43/85%, fotoperíodo de 12 horas, aproximadamente, e uma média de densidade máxima de fluxo de fótons de 310-400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medidos ao nível da planta (IRGA modelo LCA-4, Hoddesdon, UK). O experimento foi instalado em DBC, com 3 blocos e 1 unidade experimental com um recipiente de 400 mL, contendo 1 única planta.

### 4.2 Descrição dos tratamentos

ASM foi fornecido como 50% de ingrediente ativo em uma formulação comercial em grânulo seco. Para pulverizações foliares, um volume suficiente de uma solução foi completado com água destilada para uma concentração final de



0.2 mg ASM mL<sup>-1</sup>. Ecolife®, um produto comercial originado de polpa cítrica, foi fornecido por Quinabra S.A. (Química Natural Brasileira, São José dos Campos, SP, Brasil), como uma formulação aquosa, contendo polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos orgânicos diluídos. A dose escolhida foi baseada tanto na recomendação do fabricante, quanto em pré-ensaios envolvendo diluições em série, sendo fixada em 1,5 mL Ecolife® L<sup>-1</sup>, em um volume suficiente para as pulverizações completado com água destilada. Silicato de potássio solúvel (K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) foi fornecido por Quinabra S.A. e um volume suficiente para pulverizações foi ajustado em dose de 5 mL K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>L<sup>-1</sup>, após pré-ensaios similares aos feitos com Ecolife®.

Filtrado aquoso de *Crinipellis pernicioso* ('30% CPA') foi obtido a partir do cultivo de micélio. A partir de uma cultura axênica dessa espécie foi repicado um disco da cultura para uma solução nutritiva composta por batata, dextrose e água estéril (2:0,2:10 m/m/v), onde foi deixado, sob agitação constante de 100 rpm em agitador orbital. Após 15 dias, 60 g da biomassa obtida foram filtrados a vácuo em sistema-funil de Buchner com papel Whatman n°1 acoplado a um kitazato, para separação grosseira do caldo nutriente. Em seguida a biomassa foi exaustivamente lavada, ressuspensa em 200 mL de água destilada e transferida para um balão de 1000 mL, onde recebeu tratamento térmico de 100°C durante 1 hora em refluxo. Após o resfriamento, o micélio foi, em condições assépticas, novamente filtrado e a fase líquida coletada. Imediatamente a amostra foi congelada em freezer -20°C para uso experimental.

Frações heterogêneas de quitosana provenientes de micélio de *Crinipellis pernicioso* '20% MCp' obtidas da 2ª filtração do item anterior foram separadas e secas ao ar, em condições refrigeradas e assépticas. Em seguida receberam o tratamento para extração de quitosana sugerido por Synowiecki e Al-Khateeb (1997), simplificado. 20 g de massa fúngica foram misturados a NaOH 2% em proporção 1:30 (p/v) e tratados termicamente por 2 h a 90°C para

deproteinização. Em seguida o sistema foi centrifugado a 4000 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O material então recebeu lavagem exaustiva até equilibrar-se o pH em 7,0. Em seguida o material obtido foi pesado e misturado a uma solução de ácido acético 10% na proporção de 1:40 (p/v), sendo o sistema deixado a 60°C durante 6 horas, para a extração de quitosana. O material foi novamente filtrado e exaustivamente lavado até pH 7,0. Imediatamente após, a biomassa tratada foi transferida para um misturador com água destilada q.s.p. 1:5 (p/v), onde permaneceu sob condição de desintegração até a obtenção de uma suspensão finamente dividida. A amostra foi então acondicionada em freezer -20°C para uso experimental.

Tecido caulinar de lobeira (*S. lycocarpum*), arbusto hospedeiro silvestre de *C. perniciosus*, densamente infectado e necrosado por este fungo, foi coletado para secagem a 60°C por 24 horas e posterior trituração seguido de moagem. O sintoma de interesse produzido pela interação patógeno-hospedeiro foi caracterizado pelo superbrotamento de ramos e entrenós, hiperplasia e hipertrofia celular, caracterizando 'vassoura-de-bruxa', em seu estágio de 'vassoura seca'. O pó obtido do tecido necrosado foi armazenado sob refrigeração a 4°C.

Pó de vassoura de lobeira, totalizando 120 g, foi dividido em 8 alíquotas de 15 g, com cada alíquota sendo ressuspensa em aproximadamente 50 mL de água em erlenmeyer de 250 mL. Os erlenmeyers foram então dispostos em agitador orbital, onde sofreram agitação de 130 rpm durante 5 horas. Em seguida, o extrato foi filtrados a vácuo em sistema funil com novelo de algodão acoplado a um kitazato, para separação dos resíduos. Por fim, a amostra foi congelada em freezer -20°C para uso experimental, com o tratamento sendo denominado '30% VLAF'.

Pó de vassoura de lobeira, totalizando aproximadamente 90 g, foi ressuspensa em 300 mL de água destilada e transferido para um balão

volumétrico de 1 L. O conjunto recebeu tratamento térmico de 100°C durante 1 h, em refluxo. Após resfriamento, o extrato foi filtrado a vácuo em sistema funil com novelo de algodão acoplado a um kitazato, para separação dos resíduos. Após o resfriamento, a amostra foi congelada em freezer -20°C para uso experimental, com o tratamento sendo denominado '30% VLA'. Todo o processo de obtenção de pó seco foi conduzido utilizando-se também tecido sadio de ramos de lobeira, sendo o extrato aquoso, obtido da mesma forma que '30% VLA', denominado '30% FLO'.

Tecido foliar de cafeeiro (*Coffea arabica*), densamente infectado com *Hemileia vastatrix*, foi coletado para secagem a 60°C por 12 horas e posterior trituração, seguido de moagem. O sintoma de interesse produzido pela interação patógeno-hospedeiro foi caracterizado pela formação de pústulas pela agregação de uredínios e urediniósporos na face abaxial do limbo foliar. Em média foram selecionadas folhas com aproximadamente 40% de área total tomada por pústulas da ferrugem do cafeeiro. O pó obtido do tecido foi armazenado sob refrigeração a 4°C.

Uma alíquota de 80 g do pó obtido foi ressuspensa, incubada em 270 mL de metanol (MeOH) P.A., aproximadamente, e deixada em repouso por 48 horas. Em seguida o sistema sofreu filtração, onde procedeu-se a coleta do filtrado metanólico e recondução do resíduo a uma nova re-extração por mais 48 horas. Os filtrados coletados foram transferidos para balões volumétricos de 250 mL e imediatamente submetidos à secagem do solvente por evaporação mediada a evaporador rotatório, em temperatura e rotação constantes de 30°C e 50 rpm, respectivamente. Após a secagem do solvente, o precipitado foi ressuspensa em 300mL de água destilada, homogeneizada em uma suspensão finamente dividida e congelada em freezer -20°C para uso experimental, com a amostra sendo denominada '30% EFID'.

Preparação de material para desprendimento físico de quitosana foi obtida seguindo a metodologia recomendada por Hortois e Lineback (1965), com significativas modificações. Quitina comercial de carapaça de caranguejo (SIGMA) foi deacetilada parcialmente. Aproximadamente, 15 g foram ressuspensos em 215 mL de NaOH 5N. A mistura foi aquecida a 100°C por 6 horas, resfriada e lavada com água destilada até pH 7,0. O material obtido foi seco ao ar e levado ao contato com uma solução de HCl 0,5 N por 10 minutos. Novamente, a mistura foi lavada com água destilada até pH 7,0. Por fim a massa foi transferida para um misturador com água destilada q.s.p 1:15 (p/v), onde permaneceu sob condição de desintegração até a obtenção de uma suspensão finamente dividida, cerca de 15 minutos. A amostra foi então acondicionada em freezer -20°C para uso experimental, sendo denominada '7% Quitosana' (percentagem, neste caso, referindo-se à proporção de exposição a NaOH).

#### **4.3 Toxidez direta sobre o patógeno, manutenção e inoculação do isolado**

Um isolado virulento de *Xanthomonas vesicatoria* foi mantido em ágar dextrose-nutriente (NYA), em uma câmara regulada em 4°C após isolamento a partir de material infectado e ulterior confirmação por testes químicos. Inoculo foi preparado a partir de células situadas na fase *log* inicial, as quais foram obtidas pelo crescimento do isolado em um meio nutriente de levedura, incubado a 26°C em um agitador orbital ajustado para 200 rpm, por 12 h. Bactérias foram então concentradas por centrifugação (2x, cada qual a 3000g por 5 min), e ressuspensas em água estéril. A concentração foi ajustada pela diluição da suspensão com OD<sub>540</sub> fixada em 0.20 (10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>). 50 mL da suspensão ajustada foram atomizadas em folhas de plantas de tomate com 15 dias da sementeira, até o ponto de escorrimento. Imediatamente plantas foram transferidas para uma câmara de incubação com 33/30°C e 95/100 % de umidade

relativa, onde permaneceram por 12 h. Em seguida as plantas foram transportadas de volta à casa de vegetação.

Para os ensaios de inibição *in vitro* de crescimento de Xv, extratos naturais, químicos e formulações comerciais estudados, na presença de sulfato de estreptomicina 1000 ppm e água estéril (respectivamente, controles – e +), foram filtrados com uma membrana Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  e submetidos ao teste, seguindo uma metodologia de Samy et al. (1999), adaptada. Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram embebidos (2x) com 20  $\mu\text{L}$  de cada tratamento e, seguindo-se de secagem, foram transferidos para um meio MBI (Kado e Heskett, 1970) sólido em placa de Petri, previamente inoculado com o isolado virulento de Xv, em suspensão ajustada para  $\text{OD}_{540} = 0.20$ . Halos de inibição concêntricos foram avaliados após 48 h de incubação em câmara de crescimento ajustada para 28°C, com fotoperíodo de 12 h.

#### 4.4 Quantificação de doença e coleta de material fresco

Para medição e quantificação da eficiência na proteção de planta dos extratos testados, foi adaptada uma escala de doença baseada em Sidhu e Webster (1977). Plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada com 15 dias da sementeira foram pulverizadas com os tratamentos estudados até o ponto de escorrimento, às 18:00 horas. Após 4 dias todas as plantas, pulverizadas com os tratamentos e pulverizadas com água destilada (testemunha-controle), foram inoculadas com uma suspensão bacteriana de *X. vesicatoria* e avaliadas ao longo de 3, 6, 9, 12, 15 e 20 dias após inoculação (DAI). Severidade de doença foi quantificada por meio de análise visual convertido em percentagem de severidade, seguindo uma escala (1-4) de área lesionada: 1, lesões presentes em 0-25 % de área foliar; 2, lesões presentes em 26-50 % de área foliar; 3, lesões presentes em 51-75 % de área foliar; 4, >76 % de área coberta por manchas foliares. O cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD)

se deu por meio da seguinte fórmula:  $AACPD = \Sigma ((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$ , onde Y representa a intensidade da doença, t o tempo e i o número de avaliações no tempo (Campbell e Madden, 1990). Proteção de planta foi estimada pela relação:  $(1-x/y)$ , onde x representa AACPD das plantas tratadas e y, AACPD dos controles (Li et al., 1996). O experimento foi conduzido duas vezes.

Em outro esquema experimental, plantas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, 15 dias após sementeira, foram pulverizadas com '20% MCP'; '30% VLA'; Ecolife® (1,5 mL L<sup>-1</sup>) e ASM (0,2 mg mL<sup>-1</sup>) até o ponto de escorrimento. Plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água (controle) foram coletadas em 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após pulverizações (HAP), continuando em 3, 6, 9 e 12 dias após as pulverizações (DAP). Tratamentos pulverizados e inoculados foram coletados somente em 6, 9 e 12 DAP. A inoculação com a suspensão de Xv foi conduzida 4 DAP em plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água destilada. Antes de cada coleta, às 9:00 h, as plantas foram transferidas para uma câmara ajustada para 27°C, 75% de umidade relativa e 230  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidade de fluxo de fótons, por 1 hora. Em seguida, as folhas foram coletadas, homogeneizadas e amostradas, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente utilizadas para determinações bioquímicas.

#### 4.5 Determinações enzimáticas

Material foliar foi homogeneizado por meio de almofariz e pistilo em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo EDTA 0,1 mM durante 5 minutos, sobre um banho de gelo. Após filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 13000 x g por 15 min e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. Todos os passos foram executados em 0-4°C. Proteína solúvel contida nos extratos foi aferida pelo ensaio de Bradford (1976), usando um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de peroxidases de guaiacol foi determinada pela adição de 25µL do extrato enzimático ajustado para 2 mL de uma solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20mM e peróxido de hidrogênio 20 mM. Após incubação em 30°C por 10 min, a absorbância foi medida a 480 nm (Urbanek et al., 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD<sub>480</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta 480\text{nm mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Atividade de oxidases de polifenóis foi determinada pela adição de 50µL do extrato enzimático ajustado para 3 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5 e pirocatecol 25 mM. Após 10 min a 30°C, foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (Gauillard et al., 1993). Uma atividade PPO foi expressa pela variação de 1 OD<sub>410</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta 410\text{nm mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). A atividade de fenilalanina amônia liases foi determinada seguindo método adaptado por Mori et al. (2001). 200 µL do extrato enzimático, previamente dialisado por aproximadamente 16 h contra tampão Tris-HCl 100mM, pH 8,8, foram misturados a uma solução contendo 200µL de fenilalanina 40 mM, 20µL de β-mercaptoetanol 50mM e 480µL de Tris-HCl 100 mM, pH 8,8. Após incubação a 30°C por 1 h, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de HCl 6 N e a absorbância a 290 nm foi medida. A quantidade de ácido *trans*-cinâmico formado foi dosado por comparação com uma curva padrão (0,01-0,1 µg de ácido *trans*-cinâmico mL<sup>-1</sup>), e valores foram convertidos e expressos em pKat mgP<sup>-1</sup>. Atividade de quitinases foi determinada pela adição de 70 µL do extrato enzimático ajustado para 310 µL de uma solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 60 µL de CM-Chitin-RBV (2 mg mL<sup>-1</sup>), um substrato específico para quitinase fornecido por LOEWE Biochemica GmbH, em micro-placas de 96 cavidades (96-wells, 350 µL cavities). Após incubação a 35°C por 80 min, as amostras foram acidificadas com 50 µL de HCl 0,5 N, resfriadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas (1450 x g por 10 min). Uma alíquota de 210 µL do sobrenadante

de cada amostra foi transferida para uma nova micro-placa para leitura em 492 nm em um leitor EIA-compatível (Wirth e Wolf, 1990). A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases foi medida seguindo modo análogo, apenas trocando o substrato para CM-Curdlan-RBB ( $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ; LOEWE Biochemica GmbH) e modificando a alíquota do extrato enzimático para  $100 \mu\text{L}$  (deduzindo o volume do tampão acetato a fim de ajustar o volume final de  $310 \mu\text{L}$  por cavidade). Para promover ação hidrolítica de  $\beta$ -1,3-glucanase foi adotado um tempo de incubação de  $35^\circ\text{C}$  por 100 min. Amostras foram então medidas fotometricamente em filtro de 620 nm de um leitor EIA. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas.

Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições nativas, foi ensaiada de acordo com Laemmli (1970), usando-se um gel de separação de 12,5 % sobreposto por um gel de empilhamento de 5 %. Extratos enzimáticos foram preparados em presença de azul de bromofenol e glicerol, sendo centrifugados em *spin* antes da corrida. Um volume referente a um valor fixo de  $5 \mu\text{g}$  de proteína de cada amostra foi adicionado aos poços do gel de empilhamento. Para revelação de atividade quitinásica no gel, glicol-quitina 0,01 % (m/v) foi misturado ao gel de separação dos ensaios, deduzindo-se o valor referente da solução no volume da água Milli-Q usada. Após a corrida, o gel foi submergido em calcoflúor branco M2R diluído em Tris-HCl 0,5 N, pH 8,9 por 5 min e, em seguida, lavado exaustivamente. Finalmente, o gel foi incubado a  $38^\circ\text{C}$  por 12 h antes do registro fotográfico por exposição à UV. Perfis eletroforéticos foram apresentados em forma negativa, com a atividade lítica aparecendo em bandas escuras (Trudel e Asselin, 1989).

Para revelação de peroxidases, ao fim da corrida eletroforética, o gel foi mergulhado em 20mL de uma solução consistindo de diaminobenzidina (10mg), tampão Tris-HCl 2M, pH 8,3 (1,0mL), peróxido de hidrogênio 30% (0,02mL) e água Milli-Q (q.s.p. 20,0mL). Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada. Esse tipo de revelação



teve por objetivo revelar as bandas protéicas com atividade peroxidásica, pela metodologia de Towbin et al. (1979), adaptada.

#### 4.6 Determinação de fenóis totais, lignina e pigmentos

Determinação colorimétrica de fenóis totais foi baseada no procedimento de Spanos e Wrolstad (1990). 100  $\mu\text{L}$  do extrato bruto foram adicionados em tubos a uma solução contendo 900  $\mu\text{L}$  de água destilada, 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 (v/v) e 4 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5 % (p/v). Os tubos foram então agitados e incubados por 1 h. A absorbância da solução foi medida em 765 nm e a quantificação foi baseada em uma curva padrão (100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg L}^{-1}$  de tirosina) preparada em seguida ao ensaio. Valores foram convertidos e expressos em  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de MF.

Para quantificação de lignina foi utilizado o ensaio de Monties (1989), com modificações. Uma alíquota de 0,2 mg de tecido foliar fresco foi homogeneizada e incubada com acetona PA 85% por 48 h, e centrifugado 7500 x g por 15 min. O sobrenadante pigmentado foi separado do precipitado e as absorbâncias ( $\text{OD}_{647}$ ,  $\text{OD}_{664}$ ,  $\text{OD}_{455}$ ) referentes à determinação de pigmentos foram medidas. O precipitado foi seco e incubado com 5 mL de ácido tioglicólico (SIGMA) em HCl 2 N 1:10 (v/v) durante 4 h. Amostras foram então centrifugadas 7500 x g por 15 min duas vezes e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos onde receberam 200  $\mu\text{L}$  de HCl 10 N. Após o banho de gelo de 4 h e uma centrifugação de 7500 x g por 30 min, o pellet obtido foi homogeneizado em 5 mL de NaOH 0,5 N e a absorbância a 280 nm foi medida. Quantidade de derivados TGA (lignina ácido-solúvel) formada foi medida pela comparação com uma curva padrão (0,01-0,1 mg éter 2-hidroxipropílico  $\text{mL}^{-1}$ ) e valores foram convertidos e expressos em  $\mu\text{g mg}^{-1}$  MF. Pigmentos extraídos por acetona PA 85 % foram calculados usando equações encontradas em Knudson et al. (1977), com resultados em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ : Clorofila a =

$(13,7 \times OD_{664}) - (5,76 \times OD_{647})$ . Clorofila b =  $(25,8 \times OD_{647}) - (7,6 \times OD_{664})$ .  
Carotenóides =  $(4,75 \times OD_{455}) - ((Cl. a + Cl. b) \times 0,226)$ . Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

#### 4.7 Delineamento experimental e métodos estatísticos

Delineamento em blocos casualizados foi utilizado nos experimentos de quantificação de doença e experimentos de época de coleta de material vegetal, envolvendo plantas tratadas (pulverizadas), plantas tratadas e inoculadas; testemunhas (controles) pulverizadas com água e pulverizadas com água e inoculadas. Estatística descritiva, análise de variância, testes F e Tukey ao nível de significância de 5 % foram conduzidos utilizando-se o procedimento *general linear model* (GLM) do SAS (*Statistical Analysis System Inc.*, Cary, NC, USA). Quando efeitos de tratamentos foram diferentes ( $P < 0,05$ ), médias foram separadas pelo teste t de Student, com o auxílio do SISVAR (© Daniel Furtado Ferreira, 2003), aos níveis de significância de 0,1, 1 e 5 %.

## 5 RESULTADOS

Dados nas Figs. 1 e 2 mostram o progresso de doença das plantas tratadas em comparação com as testemunhas (controles) pulverizadas com água e inoculadas, juntamente ao valor de Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD), sumarizado a partir de 6 avaliações.

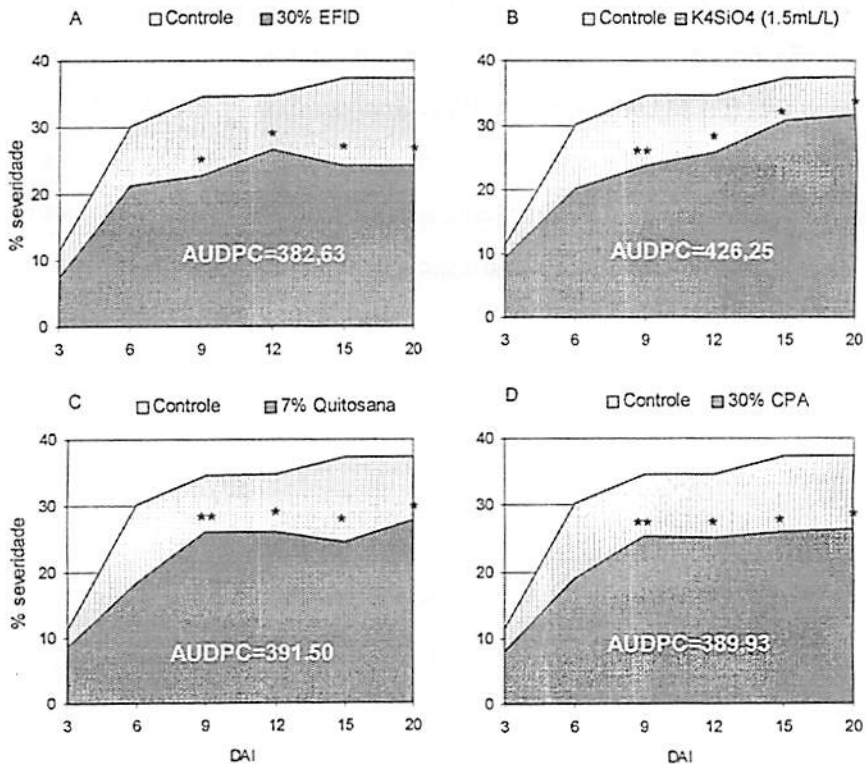


FIGURA 1. Eficácia de A. '30% EFID', B.  $K_2SiO_3$  ( $1,5 \text{ mL L}^{-1}$ ), C. '7 % Quitosana' e D. '30% CPA', na redução de AACPD da mancha foliar causada por *X. vesicatoria* em tomate cv. Santa Cruz Kada, aos 3, 6, 9, 12, 15 e 20 DAI. Asteriscos referem-se a diferenças significativas a (\*)  $P=0,05$ , (\*\*)  $P=0,01$  e (\*\*\*)  $P=0,001$  entre controle e tratamentos, de acordo com teste t de Student (LSD).

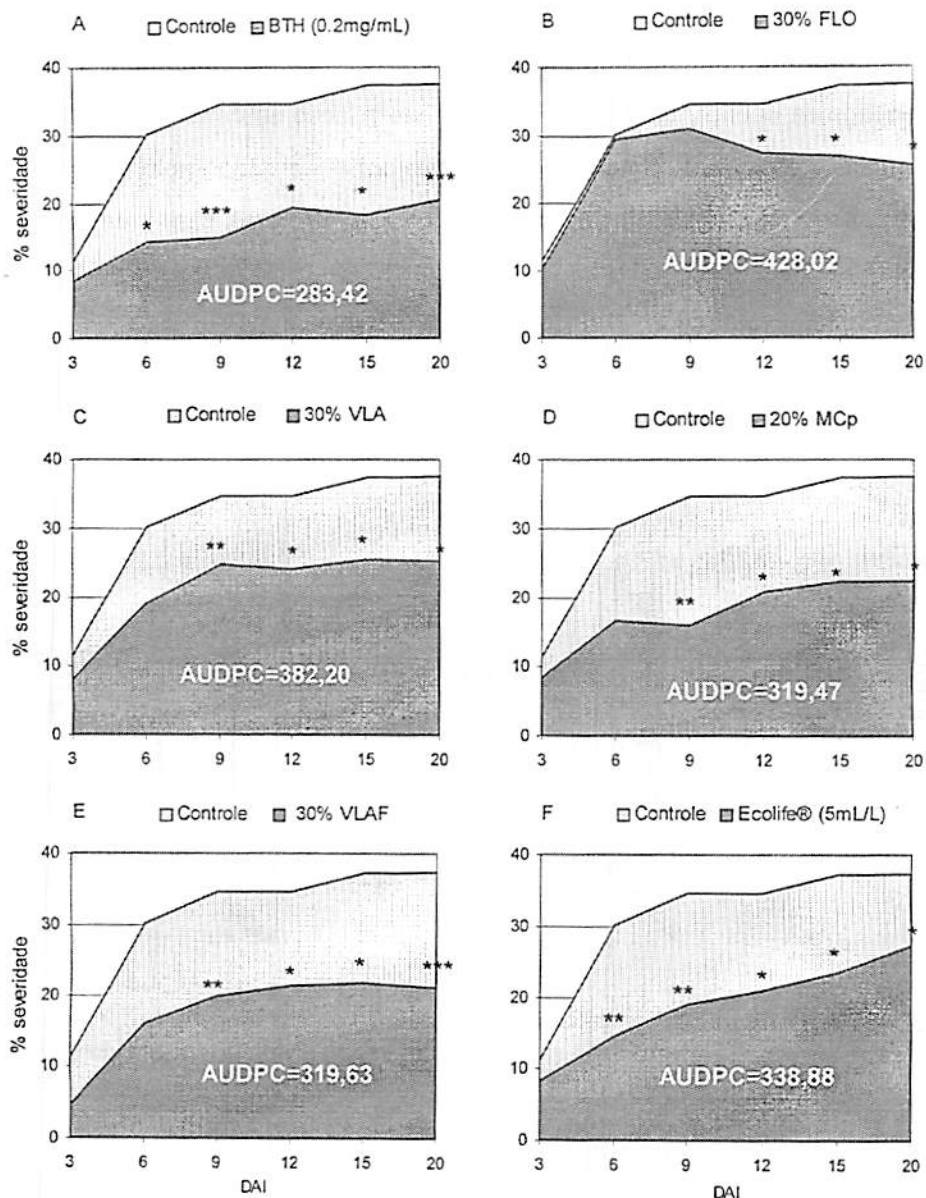


FIGURA 2. Eficácia de A. ASM (0,2 mg mL<sup>-1</sup>), B. '30% FLO', C. '30% VLA', D. '20% MCP', E. '30% VLAF' e F. Ecolife® (5 mL L<sup>-1</sup>) na redução de AACPD da mancha foliar causada por *X. vesicatoria* em tomate cv. Santa Cruz Kada, aos 3, 6, 9, 12, 15 e 20 DAI. Asteriscos referem-se a diferenças significativas a (\*) P=0,05, (\*\*) P=0,01 e (\*\*\*) P=0,001 entre controle e tratamentos, de acordo com teste t de Student (LSD).

Todos os tratamentos escolhidos causaram maior ou menor redução de severidade da doença nas plantas testadas, em relação ao controle pulverizado com água e inoculado. Sintomas de mancha foliar causados pelo isolado Xv tornaram-se visíveis nas plantas controle cerca de 48 horas após a inoculação. De uma maneira geral, todas as curvas de progresso estacionaram a partir de 9 DAI e nenhum valor de severidade atingiu 40 % em média.

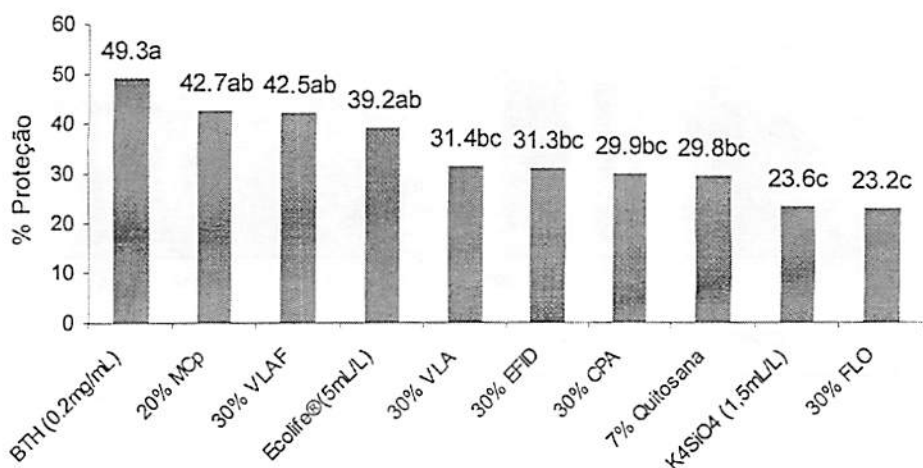


FIGURA 3. Percentagem de proteção do tomateiro contra mancha foliar causada por Xv, após 20 DAI e 6 avaliações. % de proteção foi obtida a partir dos valores de AACPD de cada tratamento, de acordo com Li et al. (1996). Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (P=0,05).

ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) exibiu a melhor performance em termos de proteção de planta, 49,3 %, com um reduzido valor de AACPD (283,42-adim.). '20% MCP', '30% VLAF', Ecolife® e '30% VLA' também mostraram respostas significativas, atingindo cerca de 87%, 86%, 80% e 64% da performance do

ASM, respectivamente (Fig. 3). Embora revelando uma redução firme no nível de severidade da doença, os demais tratamentos não incorreram em vultoso valor de proteção de planta, permanecendo em patamares menores de eficiência de redução de progresso de doença. Silicato de potássio e '7% Quitosana' mostraram controle significativo de doença nos últimos 4 pontos, obtendo respectivamente 60 % e 47 % da performance do ASM.

Ecolife® e '30% EFID' promoveram inibição *in vitro* do crescimento de colônias de Xv em meio de cultura, formando halos de inibição, em experimento controlado por sulfato de estreptomicina na concentração de 1000ppm (Tabela 1). Halos atingiram respectivamente 13,8 e 9,3 mm, diferindo significativamente do controle bactericida, entretanto.

TABELA 1. Efeitos *in vitro* de químicos, extratos naturais e formulações naturais sobre o crescimento radial de Xv. Halos concêntricos ao disco foram avaliados após 48 h de incubação a 28°C em câmara com fotoperíodo de 12 h

<sup>1</sup> Tratamento	Halo de inibição (mm)
Estreptomicina 1000 ppm	20,8 ± 0,83 a
Água destilada	0,0 ± 0,0
Ecolife® (5 mL L <sup>-1</sup> )	13,8 ± 0,43 b
ASM (0,2 mg mL <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0
'30 % FLO'	0,0 ± 0,0
'30 % VLA'	0,0 ± 0,0
'30 % VLAf'	0,0 ± 0,0
'20 % MCp'	0,0 ± 0,0
'30 % EFID'	9,3 ± 0,41 c
K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> (5 mL L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0
'7 % Quitosana'	0,0 ± 0,0
'30 % CPA'	0,0 ± 0,0

<sup>1</sup> Valores com as mesmas letras não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey (P=0,05).

Vale salientar que, comparativamente, os extratos aquosos (tanto a frio quanto a quente; '30 % VLAF' e '30 % VLA') provenientes do pó de tecido necrosado "vassoura" de *S. lycocarpum* promoveram uma significativa maior eficiência na redução de progresso de doença que seus correspondentes provenientes de pó de tecido sadio ('30 % FLO').

Ganho de altura em copa e acúmulo de massa fresca da parte aérea aos 20 DAP de plantas tratadas e inoculadas, e controles pulverizados com água e inoculados foram observados como expressão de crescimento vegetativo. Em termos de acúmulo de massa, houve diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 4).

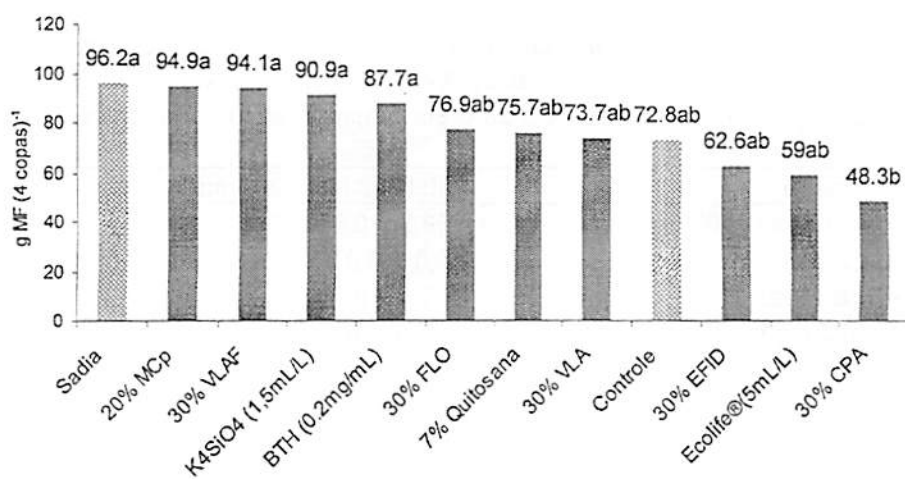


FIGURA 4. Massas frescas de quatro copas coletadas de plantas tratadas e inoculadas e controles pulverizados com água e inoculados aos 20 DAI e 35 dias após a semeadura. Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P=0,05$ ).

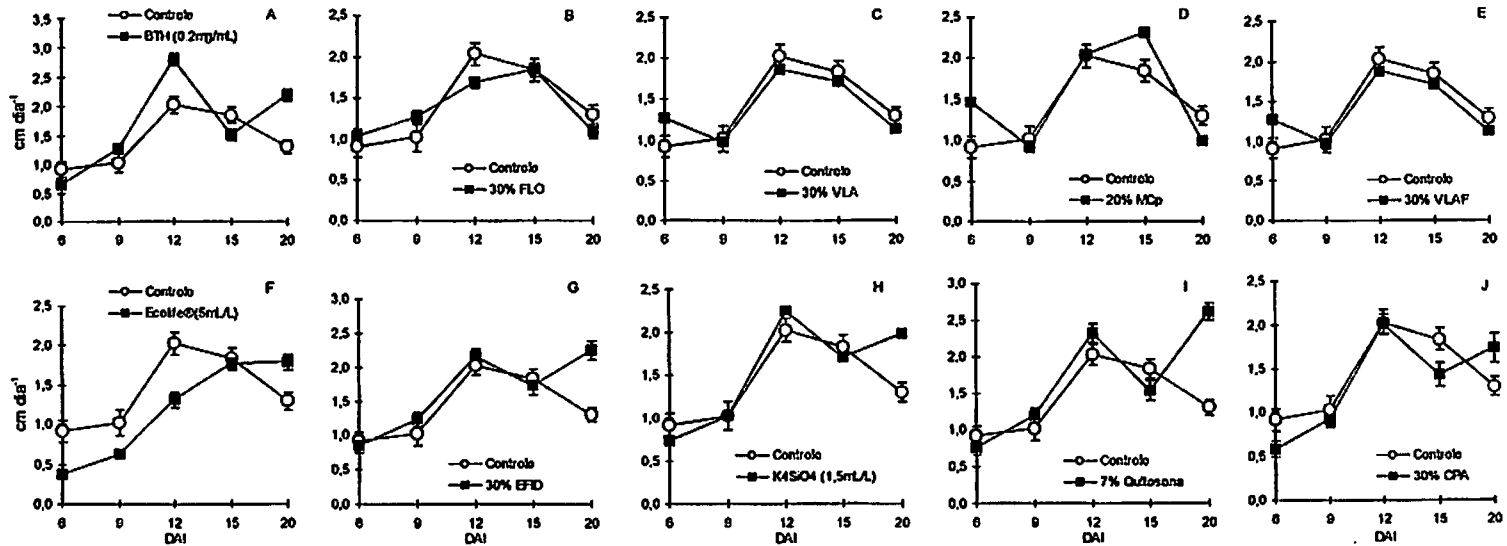


FIGURA 5. Ganho diário de altura de copa dos tomateiros cv. Santa Kruz Kada pulverizados com químicos e extratos naturais previamente à inoculação com Xv. Registros de mudança de altura de copa foram relatados aos 3, 6, 9, 12, 15 e 20 DAI. Barras de erros indicam o desvio padrão.



Com relação ao ganho de altura em copa (Fig. 5), plantas expostas aos tratamentos estudados não mostraram diferenças significativas, em comparação com os controles pulverizados com água e inoculados, a exceção das plantas tratadas com Ecolife®, que revelaram um significativo atraso no crescimento relativo em  $\text{cm dia}^{-1}$  (Fig. 5F). Foi observada uma proeminente curvatura de caule, em várias repetições de plantas tratadas com Ecolife®. Apesar disso, não foi observado sintoma de fitotoxidez em folhas. Importante lembrar que a dose escolhida foi avaliada a partir de pré-ensaios, onde foi verificada a inexistência de sintoma de fitotoxidez. Ainda, a dose escolhida não divergiu da recomendação do fabricante. Plantas tratadas por ASM, '7 % Quitosana' e  $\text{K}_2\text{SiO}_3$  (Figs. 5A, 5H e 5I) mostraram um discreto aumento (não significativo) na taxa de crescimento, em relação aos controles pulverizados com água e inoculados. Plantas tratadas com extratos de lobeira ('30% VLA', '30% VLAF', '30% FLO') revelaram um retardamento leve do crescimento (Figs. 5B, 5C e 5E), sem necessariamente se refletir no ganho de massa da parte aérea.

Aumento das atividades de enzimas relacionadas à patogênese em folhas de tomate cv. Santa Cruz Kada foi associada com a expressão de resistência induzida por '20 % MCP', '30 % VLA', Ecolife® e ASM. Considerando os estágios iniciais das respostas enzimáticas, atividade de POX teve um relevante aumento logo após 1 HAP em plantas pulverizadas com ASM, atingindo cerca de 2,1 vezes o valor do controle pulverizado com água, mantendo o nível nas avaliações seguintes (Fig. 6E). Ecolife® promoveu um aumento progressivo na atividade de POX, atingindo 3,9 vezes o controle em 24 HAP, no entanto, com aumento a partir de 8 HAP, antes de um leve declínio (Fig 6B). Plantas pulverizadas com '20 % MCP' e '30 % VLA' também promoveram aumento na atividade de POX, nas primeiras horas de acompanhamento, mostrando manutenção da diferença positiva em relação ao controle pulverizado com água cerca de 3,2 vezes o controle (Figs. 6A e 6C).

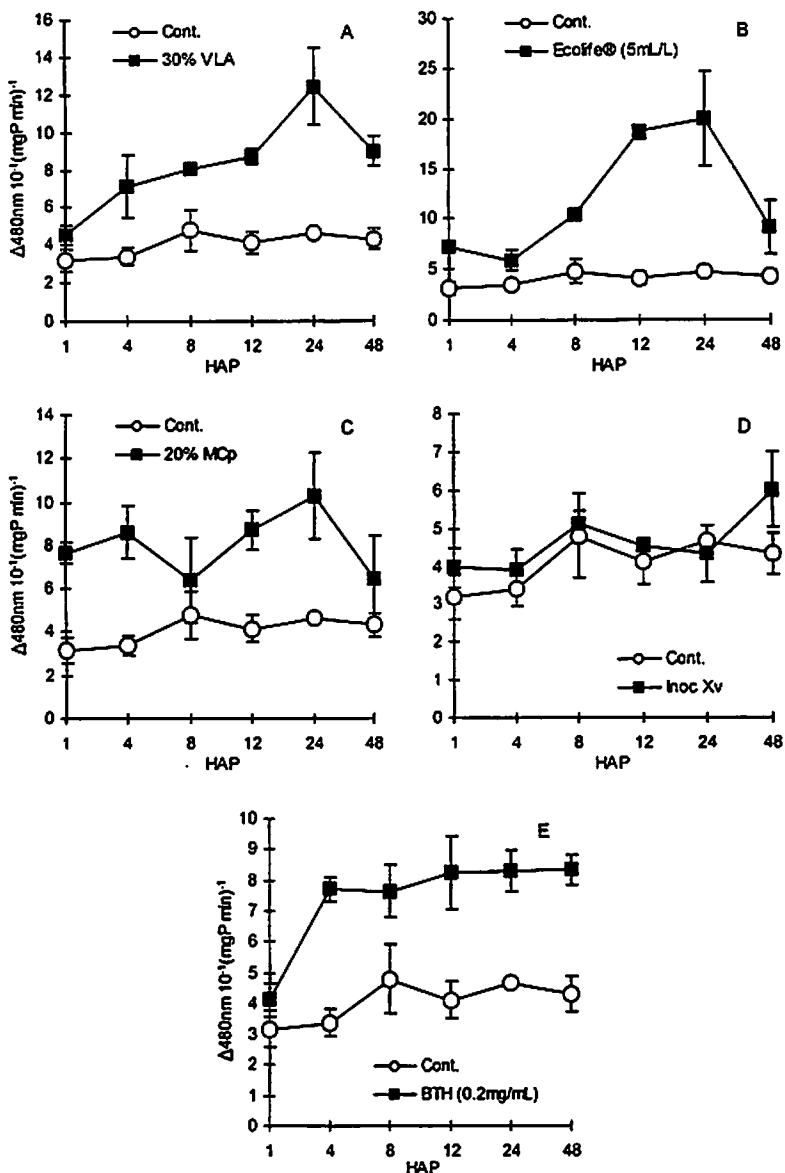


FIGURA 6. Estágios iniciais de atividade de peroxidases de guaiacol (POX) em folhas de tomateiro susceptível a Xv, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCP', D. inoculação com Xv e E. ASM. Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 HAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

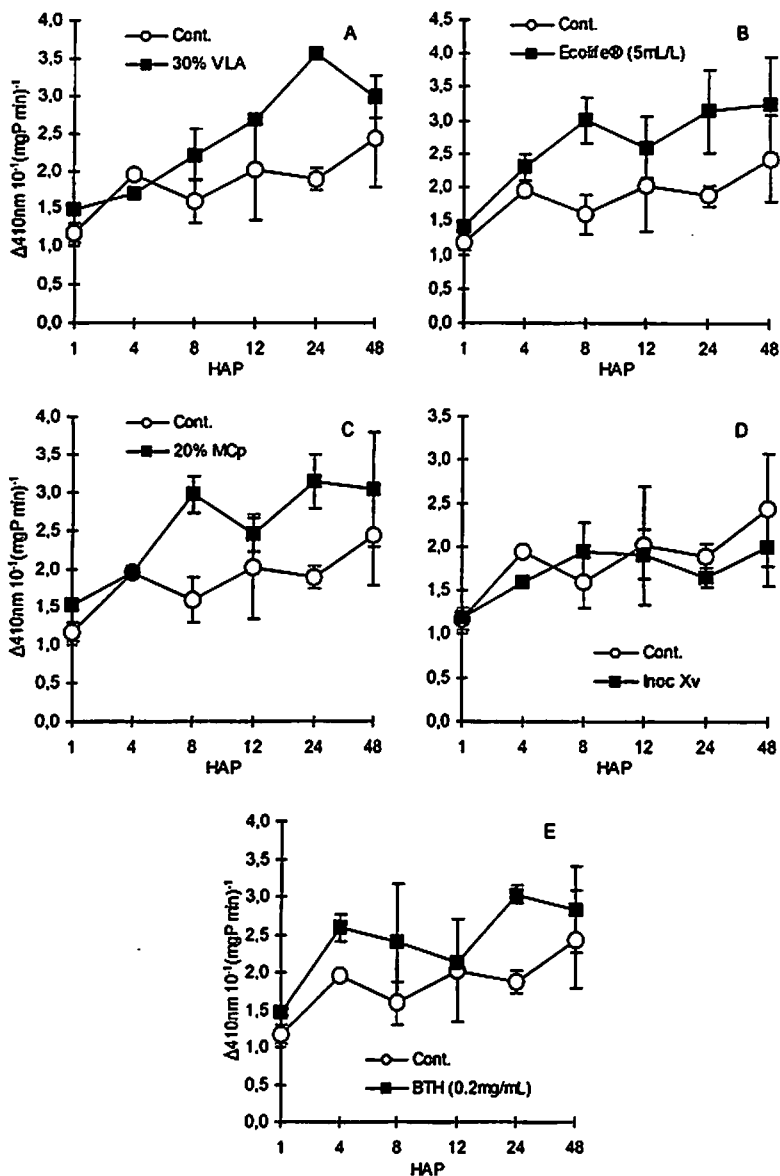
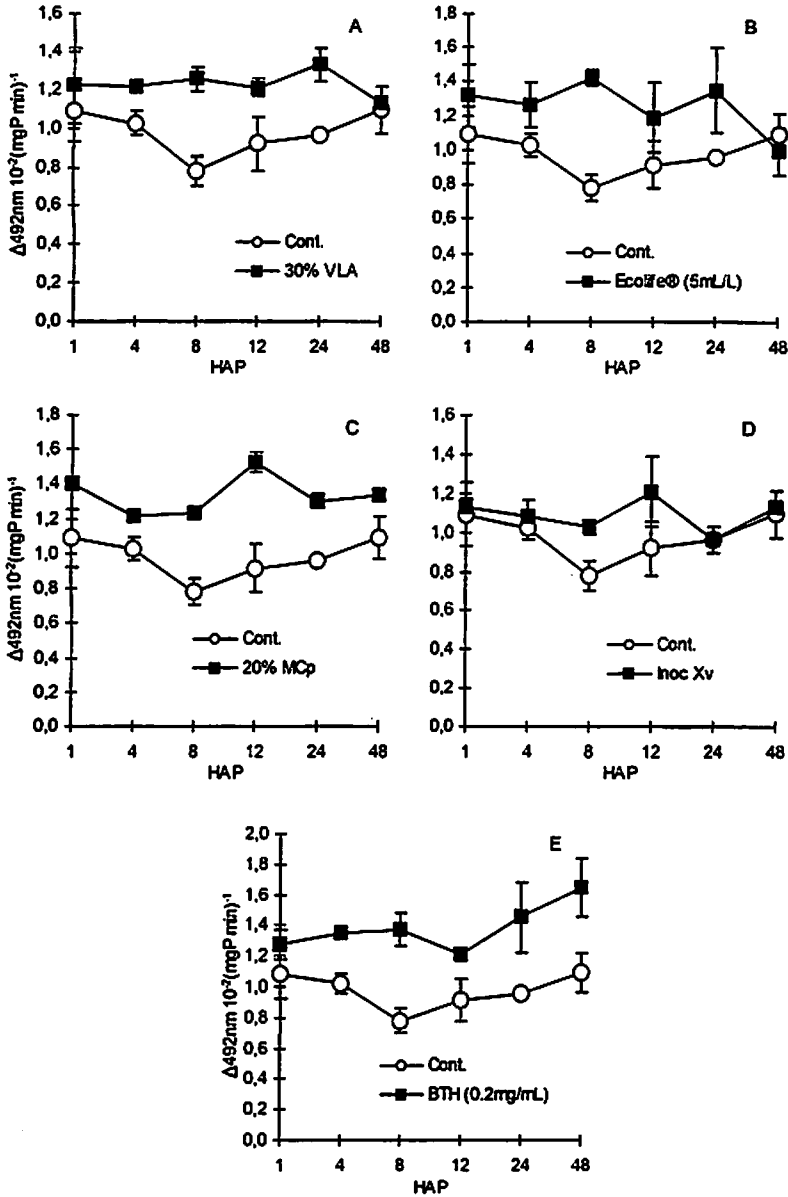


FIGURA 7. Estágios iniciais de atividade de oxidases de polifenóis (PPO) em folhas de tomateiro susceptível a Xv, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCP', D. inoculação com Xv e E. ASM. Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 HAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Plantas foram inoculadas com o isolado Xv no instante da aplicação dos tratamentos e as respostas de POX nas folhas dessas plantas curiosamente não revelaram diferenças entre elas e o controle (Fig 6D), tampouco em relação às atividades de PPO (Fig 7D). Plantas tratadas com ASM não revelaram acúmulo de atividades de PPO como observado em valores de atividade POX, exceto em 4 e 24 HAP (Fig 7E). Plantas tratadas com Ecolife® mostraram significativa tendência de aumento nas atividades de PPO foliares após 4 HAP, a despeito de um valor não significativo em 12 HAP (Fig. 7B). Embora não tão significativa, '20 % MCP' e '30 % VLA' revelaram uma tendência de atividade PPO maior do que os controles pulverizados com água, com as respostas induzidas pela primeira assemelhando-se às respostas de Ecolife® (Figs. 7A e 7C).

Aumentos de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (CHI), nos estágios iniciais após pulverização dos tratamentos sobre as folhas, foram também associados com redução de progresso de doença, evidenciada nas plantas tratadas com os extratos e formulações estudadas. Plantas pulverizadas com os tratamentos responderam significativamente com aumento na atividade de CHI com um incremento evidenciado já em 1 HAP, mantendo-se cerca de 1,5 vezes o patamar das plantas controle pulverizadas com água (Fig. 8). Plantas inoculadas com Xv no momento da pulverização dos tratamentos confirmaram a manutenção de uma tendência similar a dos controles (Fig. 8D), apenas com uma discreta diferença significativa em 8 e 12 HAP com relação aos controles pulverizados com água, considerando diferença significativa desvios de uma média que não se sobreponham em desvio referente a outra média. Plantas tratadas com '30 % VLA' revelaram aumento significativo de atividade de GLU, sustentando a tendência nas primeiras HAP (Fig. 9A), incluindo um discreto pico em 12 HAP, quando os valores atingem aproximadamente duas vezes o nível de atividade de GLU dos controles pulverizados com água.



**FIGURA 8.** Estágios iniciais de atividade de quitinases (CHI) em folhas de tomateiro susceptível a Xv, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCp', D. inoculação com Xv e E. ASM. Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 HAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

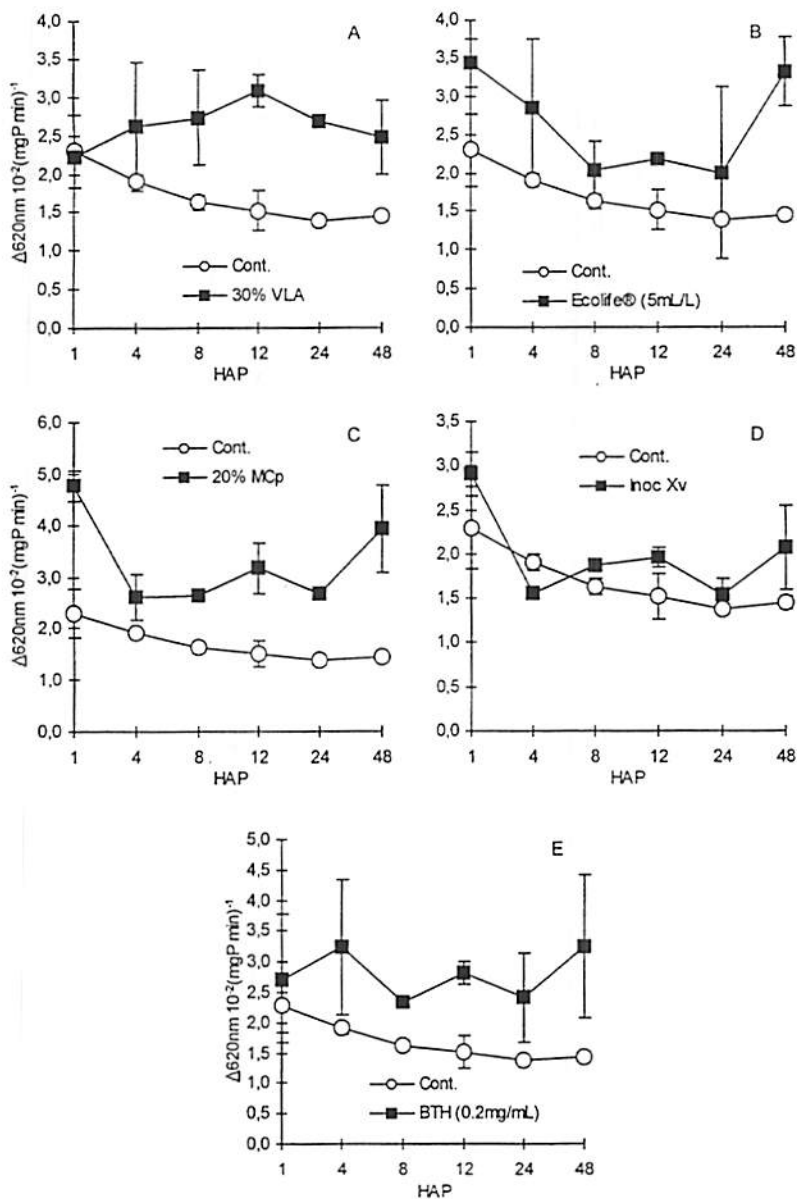


FIGURA 9. Estágios iniciais de atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) em folhas de tomateiro susceptível a Xv, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCP', D. inoculação com Xv e E. ASM. Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 HAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Um valor acentuado de atividade GLU foi observado logo

1 HAP em plantas tratadas com Ecolife® e '20 % MCp' (Figs. 9B e 9C). Em ambos tratamentos, mesmo com valores acima do patamar dos controles, houve um decréscimo na atividade GLU até 24 HAP, seguido de uma recuperação na atividade da enzima. Plantas tratadas com ASM mostraram significativo incremento e leve oscilação nas primeiras 48 HAP, com relação à atividade GLU (Fig. 9E). Novamente, plantas inoculadas com Xv no ato das pulverizações mostraram um patamar de atividade enzimática equivalente ao dos controles pulverizados com água (Fig. 9D).

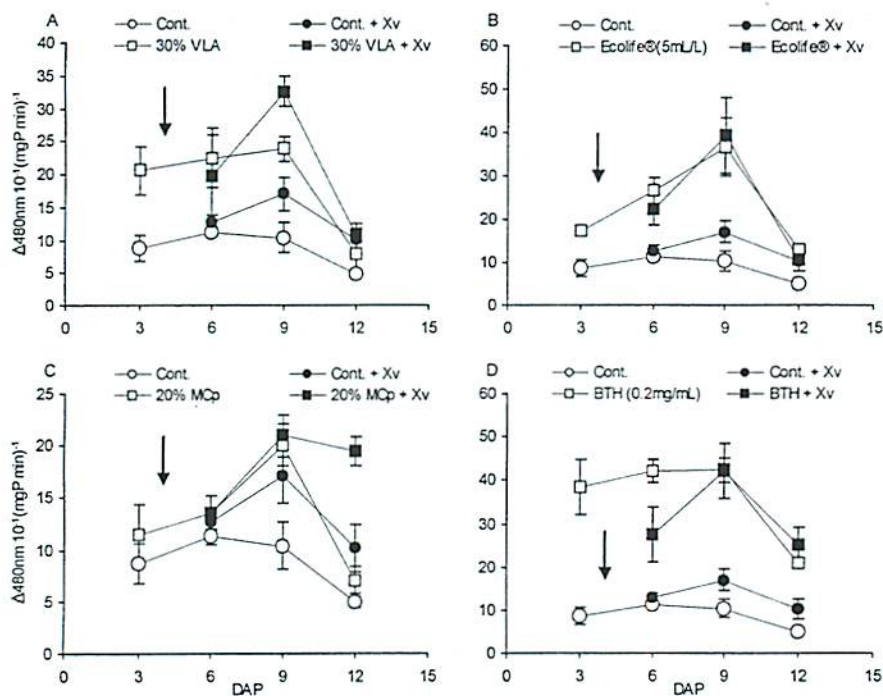


FIGURA 10. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX) em folhas de tomate susceptível, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCp', D. ASM. Setas indicam inoculação com Xv em 4 DAP. Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Em reação ao pré-tratamento com químicos, extratos e formulações naturais ao longo do período de avaliação em dias (Figs. 10-14), a atividade de POX de ambas plantas tratadas, e tratadas e inoculadas (após inoculação em 4 DAP), mostraram uma tendência de maior acúmulo, significativo ou não, em relação aos controles pulverizados com água, e pulverizados com água e inoculados (Fig. 10). Plantas pulverizadas com ASM mantiveram o patamar elevado de atividade POX encontrado no tempo horário, somente iniciando decréscimo após 9 DAP (Fig. 10D). Nesse meio-tempo, a diferença entre plantas tratadas com ASM e controles chegaram a atingir cerca de 4 vezes. Em Plantas tratadas com Ecolife® foi evidenciado um discreto aumento da atividade de POX após decréscimo em 24 HAP, mantendo-se até a redução final de atividade após 9 DAP (Fig. 10B). Plantas tratadas com '20 % MCp' e '30 % VLA' mostraram tendências parecidas, sendo que a primeira mostrou maior aumento de atividade POX, em relação à segunda e em relação aos controles pulverizados com água, e pulverizados com água e inoculados (Figs. 10A e 10C). Em todos os tratamentos estudados, respostas das plantas tratadas, e tratadas e inoculadas mostraram patamares superiores (com médias significativas e não significativas) aos dos controles pulverizados com água, e pulverizados com água e inoculados, levando-se em consideração todas as enzimas relacionadas à patogênese estudadas (Figs. 10, 11, 12, 13 e 14).

Levando-se em consideração a atividade PPO, ao longo do período de avaliação em dias, a despeito do pico de atividade das plantas tratadas com ASM, e tratadas e inoculadas, em 9 DAP, todos os tratamentos induziram respostas comparáveis a POX, sem, contudo, apresentar muitos pontos com diferenças significativas (Fig. 11). Um patente decréscimo na incrementada atividade de PAL ao longo de 3, 6, 9 e 12 DAP foi revelado em folhas de plantas pulverizadas com '20 % MCp', '30 % VLA', Ecolife® e ASM (Fig. 14). No entanto, plantas tratadas com ASM mostraram uma maior propensão a



estabilizar valores de PAL em patamares elevados, com discreta queda ao longo das coletas (Fig. 14D).

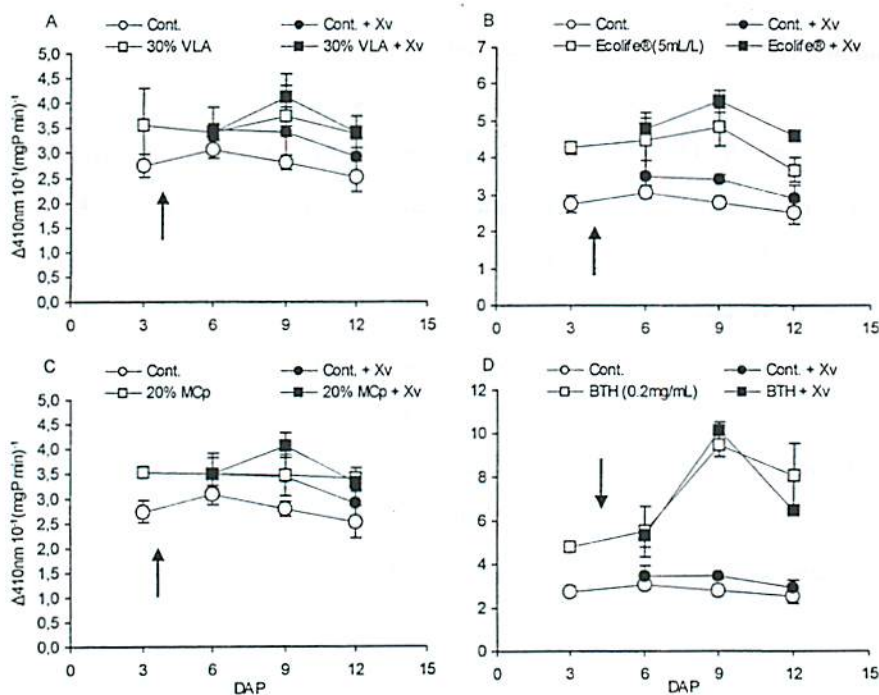


FIGURA 11. Atividade de oxidases de polifenóis (PPO) em folhas de tomate susceptível, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCP', D. ASM. Setas indicam inoculação com Xv em 4 DAP. Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Em resposta aos pré-tratamentos com químicos, extratos e formulações naturais, ao longo do período de avaliação em dias, resultados de atividade de CHI e GLU, plantas de tomateiro susceptível mostraram uma tendência similar

na dinâmica de atividade de CHI e GLU entre plantas tratadas, tratadas e inoculadas, controles pulverizados com água, e pulverizados com água e inoculados. Plantas tratadas, e tratadas e inoculadas confirmaram uma tendência de aumento da atividades de ambas enzimas, sem diferir, no entanto, significativamente, na grande maioria dos pontos estudados (Figs. 12 e 13). Esses resultados reforçam a hipótese de que os químicos, extratos naturais e formulações naturais causaram algum tipo de ativação / síntese *de novo* sobre as enzimas relacionadas à patogênese estudadas.

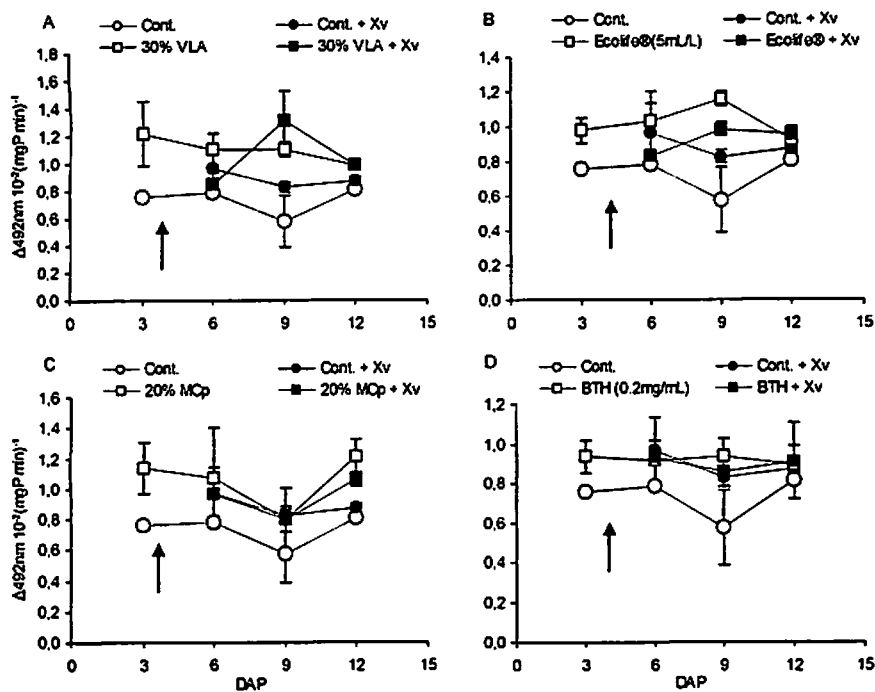


FIGURA 12. Atividade de quitinases (CHI) em folhas de tomate susceptível, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCp', D. ASM. Setas indicam inoculação com Xv em 4 DAP. Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Acumulação de derivados TGA (lignina ácido-solúvel e polímeros *lignin-like*) em plantas de tomateiro pulverizadas com água (testemunha sadia), pulverizadas com água e inoculadas (controle), tratadas, e tratadas e inoculadas foi determinada em 9 e 12 DAP (Tabela 2). Basicamente, as tendências cumulativas seguiram um padrão similar. Em 9 DAP, plantas tratadas com '30 % VLA' mostraram valores de depósito de lignina atingindo cerca de duas vezes os controles pulverizados com água, seguidos por '20 % MCp' mais inoculação, '30 % VLA' mais inoculação, Ecolife® mais inoculação e ASM. Testemunhas pulverizadas com água (sadia) e pulverizadas com água e inoculadas acumularam menor teor de lignina a 9 DAP, comparativamente.

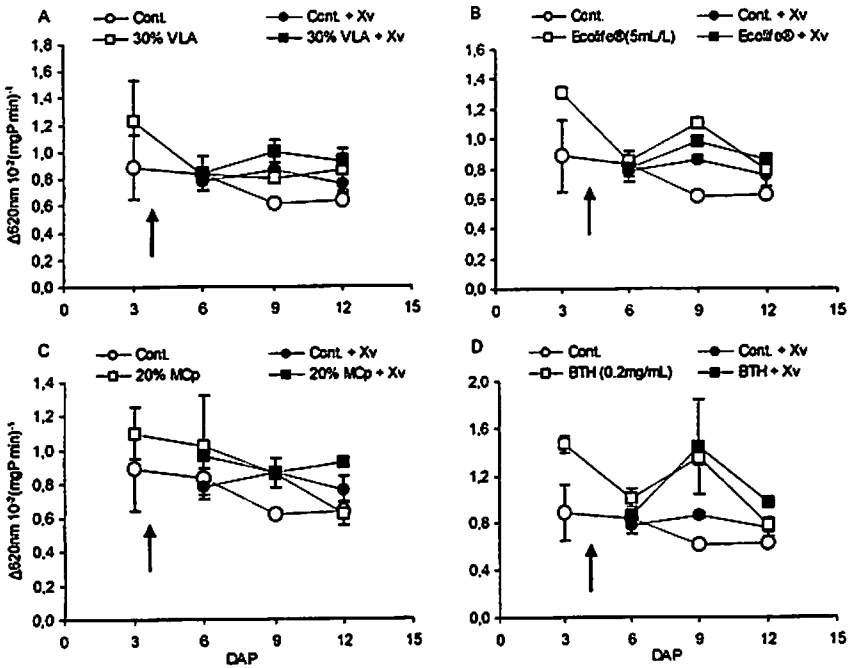


FIGURA 13. Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) em folhas de tomate susceptível, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCp', D. ASM. Setas indicam inoculação com Xv em 4 DAP. Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Semelhante tendência foi evidenciada a 12 DAP nas plantas analisadas, a despeito de um intrigante resultado mostrado por plantas controle pulverizadas com água e inoculadas, que acumularam cerca de 110 % do teor de lignina registrado em plantas tratadas com ASM. O tratamento baseado em extrato aquoso de pó de tecido obtido de vassoura-de-bruxa mostrou um significativo resultado de indução de lignificação de tecido foliar (Tabela 2).

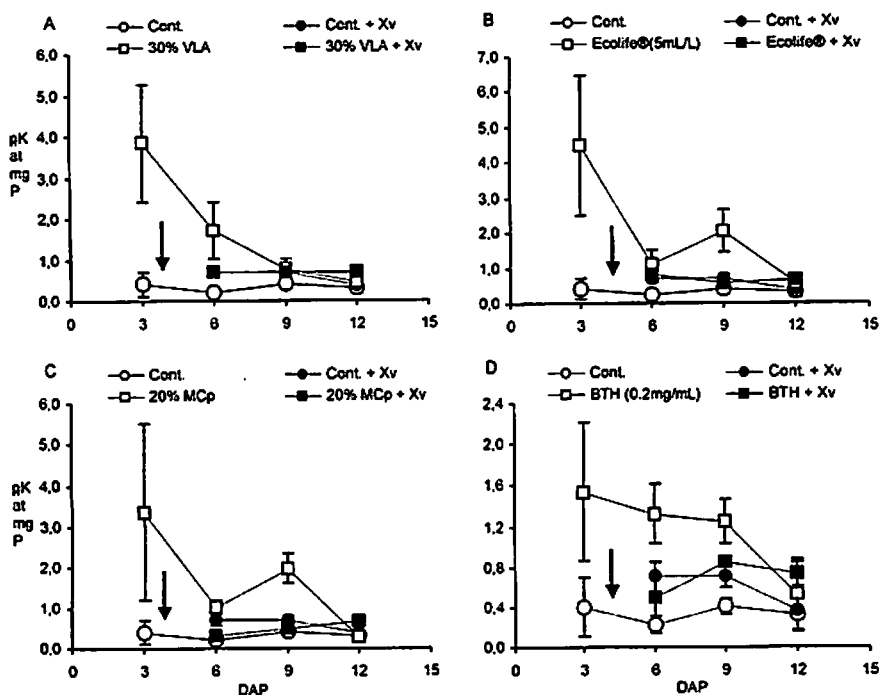


FIGURA 14. Atividade de fenilalanina amônia liases (PAL) em folhas de tomate susceptível, após tratamentos com A. '30 % VLA', B. Ecolife®, C. '20 % MCp', D. ASM. Setas indicam inoculação com Xv em 4 DAP. Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Com relação ao conteúdo de fenóis totais, houve um extensivo declínio nos valores das plantas tratadas com todos as formulações testadas. Tanto a 9 quanto a 12 DAP, conteúdo de fenóis totais em folhas de plantas pulverizadas com os extratos naturais estudados situou-se entre os maiores valores das testemunhas, e os menores valores de plantas Ecolife® e ASM.

TABELA 2. Efeitos de químicos, extratos e formulações naturais sobre a deposição de lignina (derivados TGA) e conteúdo de fenóis totais em folhas de plantas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada coletadas a 9 e 12 DAP. Efeitos de químicos, extratos e formulações naturais sobre o teor de pigmentos fotossintéticos em folhas, a 12 DAP

<sup>1</sup> Tratamentos	Lignina ( $\mu\text{g } 10^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$ )		Fenóis tt ( $\mu\text{g } 10^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$ )		Pigmentos fotossintéticos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
					Clorof. A	Clorof. B	Carotenóides
	<sup>2</sup> Dias após pulverizações (DAP)						
	9	12	9	12	12	12	12
Sadia	2,60 ± 0,30b	3,75 ± 0,09b	0,85 ± 0,05ab	1,03 ± 0,12ab	7,50 ± 0,05b	3,70 ± 0,32c	1,27 ± 0,04ab
Controle	3,06 ± 0,74ab	4,82 ± 0,77ab	0,95 ± 0,13a	1,23 ± 0,11a	8,70 ± 1,67ab	7,20 ± 0,58ab	1,32 ± 0,03ab
20% MCp	3,39 ± 0,05ab	4,20 ± 0,97ab	0,75 ± ,03abc	0,87 ± 0,06ab	9,90 ± 1,46ab	4,92 ± 0,79bc	1,49 ± 0,09a
20% MCp + Xv	4,02 ± 0,36ab	5,47 ± 0,56ab	0,86 ± 0,05bc	0,87 ± 0,15ab	10,4 ± 0,07ab	5,80 ± 0,78bc	1,40 ± 0,04ab
30% VLA	4,17 ± 0,22a	4,53 ± 0,11ab	0,67 ± 0,05bc	1,06 ± 0,02ab	10,6 ± 0,47ab	6,21 ± 0,01abc	1,38 ± 0,02ab
30% VLA + Xv	3,84 ± 0,47ab	6,02 ± 0,07a	0,66 ± 0,07bc	0,90 ± 0,08ab	11,9 ± 0,05a	8,70 ± 0,03a	1,14 ± 0,24ab
Ecolife®	3,27 ± 0,32ab	3,96 ± 0,41a	0,60 ± 0,01bc	0,74 ± 0,12b	10,30 ± 1,07a	5,11 ± 0,54ab	1,40 ± 0,03a
Ecolife® + Xv	3,83 ± 0,24a	4,48 ± 0,50a	0,49 ± 0,12c	0,81 ± 0,03b	8,80 ± 0,59a	4,22 ± 0,12b	1,29 ± 0,01a
ASM (0,2mg/mL)	3,43 ± 0,22ab	4,06 ± 0,11b	0,58 ± 0,01bc	0,79 ± 0,02b	9,30 ± 1,90ab	4,71 ± 0,94bc	1,13 ± 0,01b
ASM + Xv	3,39 ± 0,74ab	4,39 ± 0,11ab	0,54 ± 0,07c	0,83 ± 0,06ab	10,8 ± 1,87ab	5,61 ± 1,23bc	1,34 ± 0,03ab

<sup>1</sup> Tratamentos foram pulverizados nas folhas 15 dias após semeadura e plantas foram inoculadas com isolado virulento de Xv 4 DAP.

<sup>2</sup> Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (P=0,05).

Plantas tratadas com '30 % VLA' e inoculadas mostraram pouco maior teor de clorofila a e significativo maior teor de clorofila b, comparativamente aos outros tratamentos. De um modo geral, as plantas pulverizadas por químicos, extratos e formulações naturais tenderam a manter um teor de clorofilas maior do que nas testemunhas pulverizadas com água, e controles pulverizados com água e inoculadas. O mesmo não pode ser afirmado em relação à manutenção dos teores de carotenóides, já que as plantas infectadas e sadias revelaram muito pouca diferença entre seus teores. Mesmo assim, plantas tratadas com ASM, curiosamente, mostraram baixos teores de carotenóides em 12 DAP (Tabela 2).

Revelação em gel de enzimas relacionadas à patogênese de CHI (Fig. 15) e POX (Fig. 16), confirmou aumento de atividade específica em plantas submetidas aos tratamentos estudados. Nenhuma isoforma discrepante foi evidenciada em plantas '20 % MCP', '30 % VLA', Ecolife® e ASM.

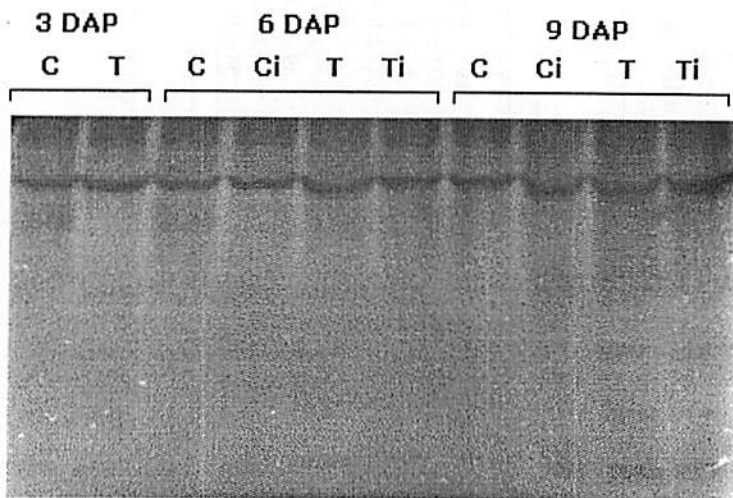
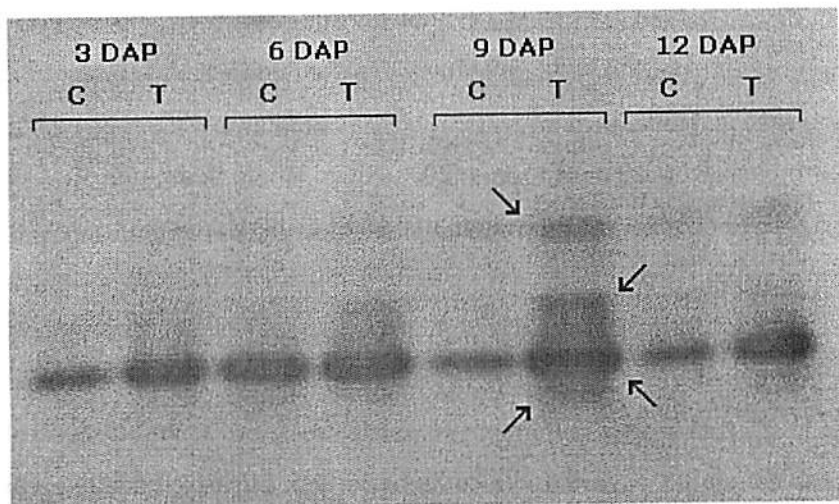


FIGURA 15. Eletroforese em condições nativas revelando isoformas de quitinases (CHI) em plantas de tomateiro pulverizadas com '30 % VLA'. Quantidade de proteína por poço: 15 µg. Tempos foram esquematizados, 3 DAP (sadia e tratada); 6 e 9 DAP (sadia, controle inoculado, tratada, e tratada e inoculada).

A



B

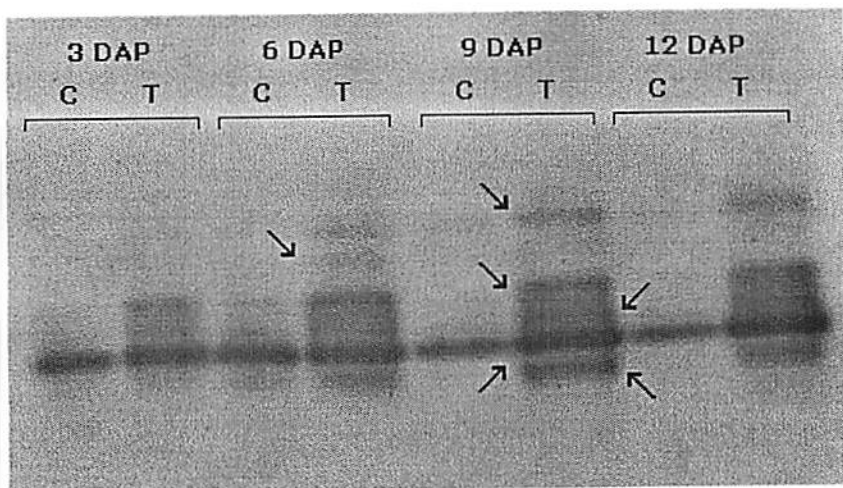


FIGURA 16. Eletroforese em condições nativas revelando isoformas de peroxidases (POX) em plantas de tomateiro pulverizadas com A. '20 % MCP' e B. ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Quantidade de proteína por poço:  $15 \mu\text{g}$ . Tempos foram esquematizados 3, 6, 9 e 12 DAP (sadia e tratada, não inoculada). Setas indicam isoformas ativas de peroxidases.



Géis revelando atividade POX de amostras enzimáticas provenientes de plantas tratadas com '20 % MCP', '30 % VLA' e Ecolife® mostraram um perfil de bandas semelhante, com a revelação de 4 isoformas ativas. A Fig. 16 mostra um perfil eletroforético de amostras '20 % MCP', como ilustração. Amostras de plantas tratadas com ASM mostraram um perfil de bandas com possivelmente 5 isoformas ativas. Com relação ao padrão de isoformas CHI, todos os tratamentos revelaram 2 isoformas marcantes e 4 discretas, com menor massa molecular (Fig. 15). Densidade de zonas líticas reveladas levemente comprova os resultados das atividades colorimétricas realizadas sobre as amostras de plantas coletadas em ambas as enzimas trabalhadas em gel. Curiosamente, em repetidas ocorrências, foi relatado o aparecimento de isoformas discretas de quitinase em plantas pulverizadas com água, em contraste com as tratadas, e tratadas e inoculadas. Figs 17 a 20 mostram registro visual do padrão sintomático encontrado nos experimentos.

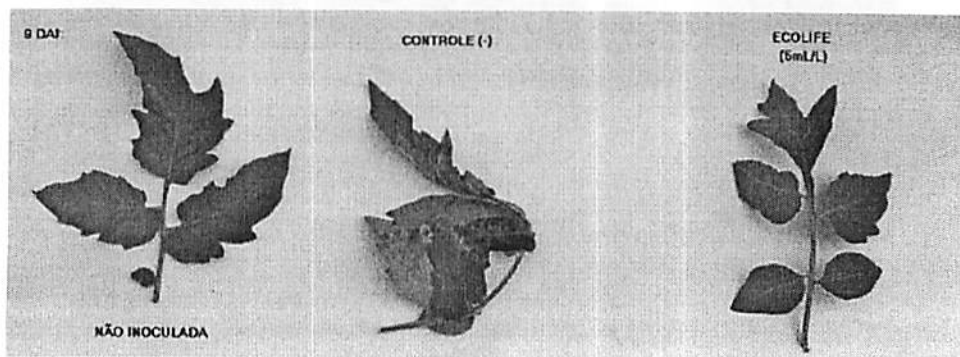


FIGURA 17. Sintomas de mancha, causada por isolado virulento de *X. vesicatoria*, em folhas de tomateiro do 2º nó a 9 DAI. Respectivamente, testemunha sadia, testemunha inoculada (controle) e planta pulverizada com Ecolife® (5 mL L<sup>-1</sup>)

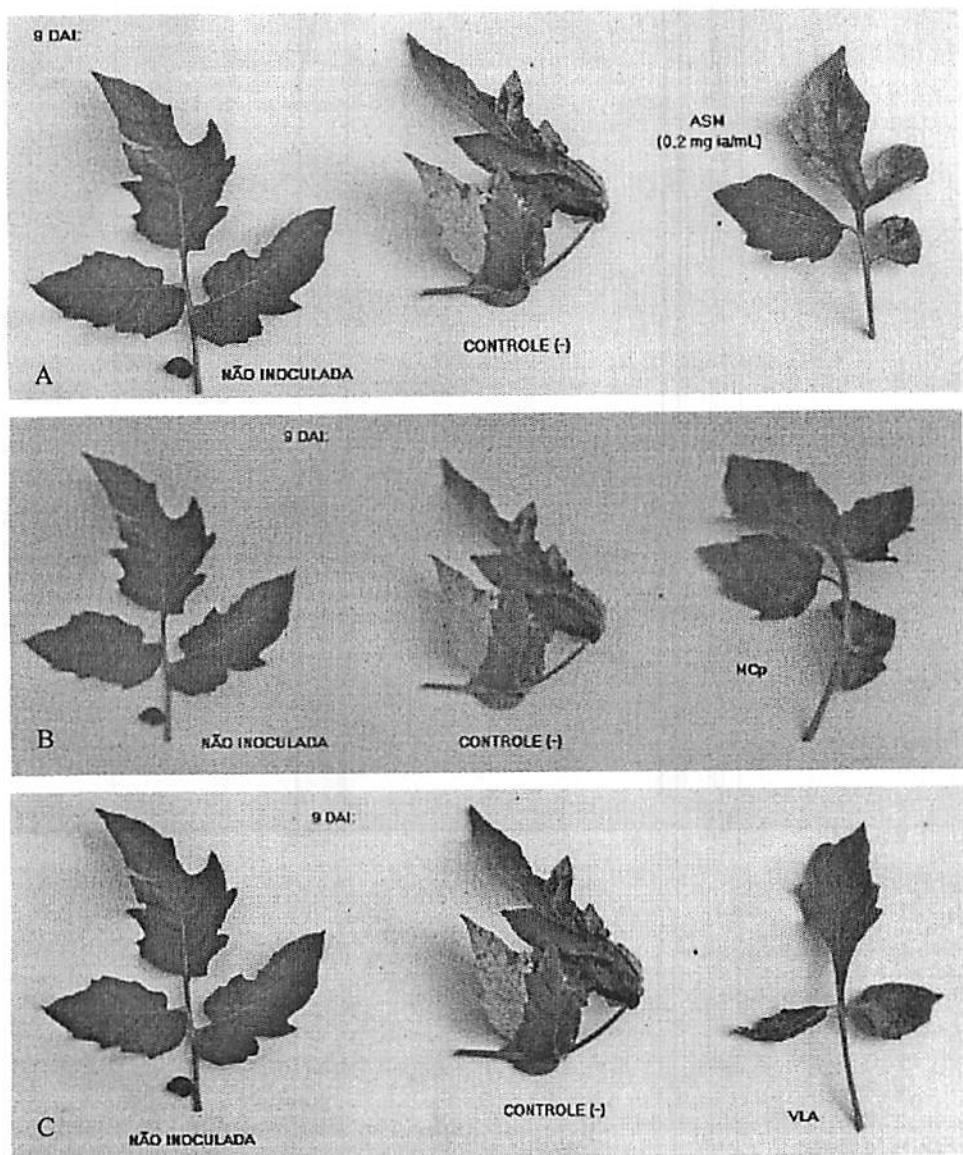


FIGURA 18. Sintomas de mancha, causada por isolado virulento de *X. vesicatoria*, em folhas de tomateiro do 2º nó a 9 DAI. Respectivamente, testemunha sadia, testemunha inoculada (controle) e plantas pulverizadas com A. ASM, B. '20 % MCp' e C. '30 % VLA'.

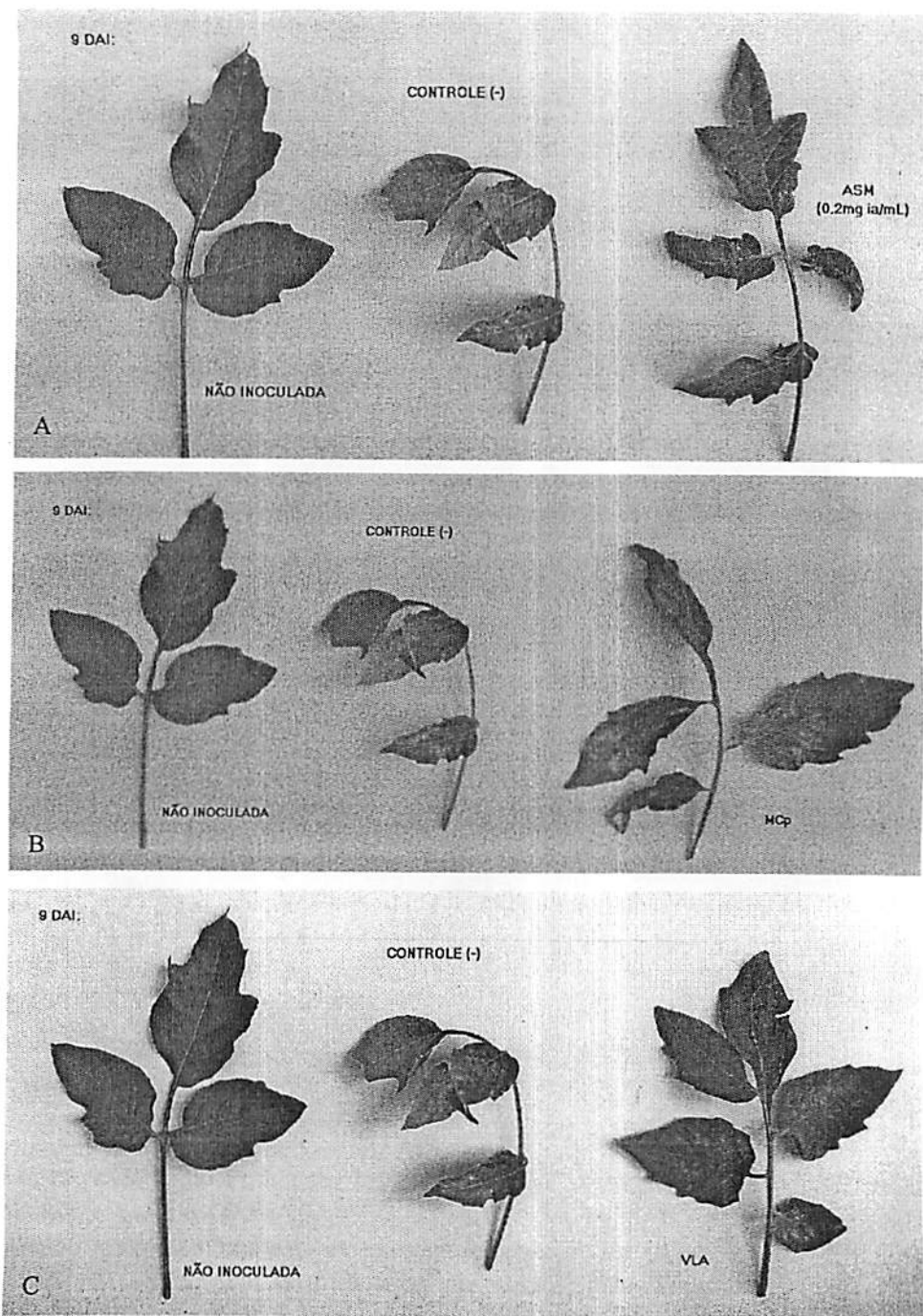


FIGURA 19. Sintomas de mancha, causada por isolado virulento de *X. vesicatoria*, em folhas do 3º nó a 9 DAI. Respectivamente, testemunha sadia, testemunha inoculada (controle) e plantas pulverizadas com A. ASM, B. '20 % MCP' e C. '30 % VLA'.

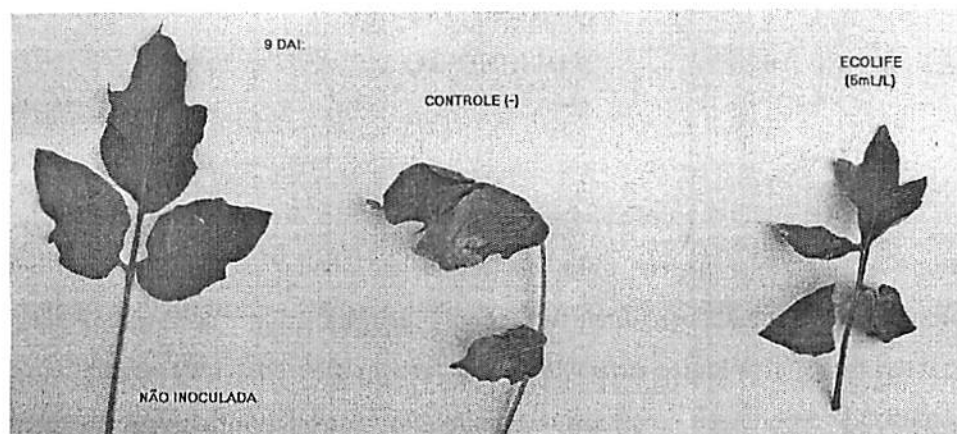


FIGURA 20. Sintomas de mancha, causada por isolado virulento de *X. vesicatoria*, em folhas de tomateiro 'St. Cruz Kada' do 3º nó a 9 DAI. Respectivamente, testemunha sadia, testemunha inoculada (controle) e planta pulverizada com Ecolife® (5 mL L<sup>-1</sup>).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados sugerem proteção do tomateiro cv. Santa Cruz Kada contra a mancha foliar bacteriana, em plantas pré-tratadas com os componentes estudados, inclusive com aqueles que não receberam caracterização fisiológica-enzimática. Na concepção dos tratamentos, foi hipotetizada a obtenção de eliciadores, como derivados de quitina provenientes de carapaças de caranguejo (SIGMA) e tecido necrótico desintegrado e heterogêneo de *S. lycocarpum* mostrando sintomas de vassoura-de-bruxa e cafeeiro acometido por ferrugem. Nesses 'coquetéis' de eliciadores pode-se incluir numerosas moléculas solúveis, tais como peptídeos, carboidratos, glicoproteínas, lipídeos e produtos diversos da interação planta-patógeno, provenientes ou não de paredes celulares do hospedeiro ou do próprio patógeno. Os quatro tratamentos mais promissores como ativadores de defesa de planta foram '20 % MCp', '30 % VLA', Ecolife® e o já comprovado ASM. '30 % VLAF' mostrou excelente performance na proteção do tomateiro, entretanto, estudos de sua ação sobre o metabolismo da planta ainda estão em andamento. Isto não impediu, contudo, que uma investigação preliminar sobre incidência de proteínas com ação eliciadora, ressuspensas neste extrato aquoso a frio, fosse iniciada (resultados apresentados no Cap. 5).

Indução de resistência no tomateiro tratado foi associado, basicamente, com aumentos de atividade de enzimas relacionadas à patogênese e PR-proteínas, como relatado no aumento médio de atividades de POX, PPO, GLU, CHI e significativos aumentos de deposição de lignina. Apesar da atividade de PAL mostrar sempre um declínio em todos os pontos ao longo do período de avaliação em dias adotado para avaliação, houve também uma indicação de

indução de respostas diferenciadas da enzima, principalmente em plantas pulverizadas com ASM.

Inibição de crescimento *in vitro* de Xv foi observada em Ecolife® e '30 % EFID', sugerindo que esses compostos poderiam agir diretamente sobre a bactéria, mesmo após 4 dias de intervalo entre as pulverizações e desafio. Embora ASM dê suporte à hipótese de indução de resistência como ativador de plantas, o mesmo não pode ser dito a respeito de Ecolife® e '30% EFID', considerando as premissas de classificação de um indutor de resistência sugerido por Kessman et al. (1994), uma vez que foi comprovado um efeito bacteriostático a partir da formulação e do extrato natural. Realmente, foi hipotetizado que altas concentrações de polifenóis e moléculas correlatas observadas em '30 % EFID' e Ecolife® induziram toxidez imediata em colônias de Xv. É bem relatado que tecido foliar de café apresenta elevado conteúdo de fenólicos (Aerts e Baumann, 1994).

Resistência pode ser induzida em plantas nas quais faltam genes de resistência, por inoculação com microrganismos não patogênicos, por inoculações com patógenos restritos e por químicos (Kessman et al., 1994; Hammerschmidt, 1999). Muitos oligossacarídeos, proteínas e glicoproteínas originados de fungos e bactérias podem funcionar como eliciadores não específicos, para induzir respostas de defesa em plantas que carreguem genes R não específicos (Heath, 2000; Nürnberger e Brunner, 2002). Quitina, um polissacarídeo linear, composto de resíduos de 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose (GlcNAc) em ligações  $\beta$ (1-4), e quitosana, um polissacarídeo parcialmente N-acetilado derivado da quitina, composto por ligações  $\beta$ (1-4) de GlcNAc e 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -glucopiranosose (GlcN), são componentes de parede celular fúngica e são relatadas como supressores de muitas doenças de planta, por sua participação em indução de resistência em plantas (Benhamou et al., 1998; Ben-Shalon et al., 2002). Derivados comerciais de acibenzolar-S-metil

(ASM) têm sido exaustivamente estudados ao longo dos anos como potencial indutor químico de resistência e iniciador de SAR (Benhamou e Bélanger, 1998; Godard et al., 1999; Cole, 1999; Anfoka, 2000; Resende et al., 2002). Vários químicos, incluindo  $\beta$ -aminobutírico (BABA),  $\beta$ -tiouracil, ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), silicatos e fosfatos têm sido relatados também como indutores de resistência contra patógenos, quando aplicados em plantas. No entanto, somente INA e ASM mimetizam o passo do ácido salicílico (Fawe et al., 1998; Cole, 1999; Bécot et al., 2000). Uma função do ácido salicílico (SA) como sinalizador endógeno para SAR foi comprovado pelo uso de um gene bacteriano, *nahG*, codificando hidroxilases de salicilato, as quais removem AS por conversão a catecol. Plantas transgênicas de fumo e de *Arabidopsis* expressando *nahG*, acumulando muito pouco AS após infecção pelo patógeno, falham em expressar genes PR, e não desencadeiam SAR (Durrant e Dong, 2004). Alguns autores relataram que silicato de potássio pode estimular mecanismos de defesa de plantas, incluindo a superprodução de compostos fenólicos, o aumento da atividade enzimática, como POX e CHI, bem como o acúmulo de lignina (Chérif et al., 1994; Fawe et al., 1998; Epstein, 1999).

No presente trabalho, o aumento nas respostas de atividades de enzimas relacionadas à patogênese foi observado poucas horas após a exposição das plantas aos químicos, extratos e formulações testados, previamente avaliados como eficazes na redução de progresso de doença. Além disso, houve deposição de lignina em folhas coletadas aos 9 e 12 DAP, mostrando alguma relação com o proeminente aumento de POX e respostas menos vigorosas de PPO e PAL. Atividades aumentadas de POX, PPO e PAL, resultando em reforço da parede celular, têm sido associados com indução de resistência local e sistêmica (Anterola e Lewis, 2002). POX têm sido associada com vários processos fisiológicos tais como, deposição de lignina e suberina frente à aclimação a estresses bióticos e abióticos, como ataque de patógenos (Boudet, 1998) e

restrição hídrica causada por salinidade (Cavalcanti et al., 2004). Em plantas, PPO tem sido associada também à lignificação, além de ser um fator na proteção de plantas injuriadas contra outros organismos invasores, pela ação tóxica de quinonas reativas produzidas a partir da catálise de compostos fenólicos (Mayer e Staples, 2002).

PAL é uma enzima chave da rota dos fenilpropanóides, envolvida na produção de compostos secundários relacionadas à defesa de plantas, incluindo o SA, fitoalexinas e monômeros de lignina (La Câmara et al., 2004). De fato, houve uma redução extensiva no acúmulo de fenólicos das plantas tratadas (Tabela 2). Foi hipotetizado que o desbalanço entre a produção e o consumo de intermediários fenólicos pode ter contribuído na queda de compostos fenólicos totais, mais do que isto, maiores atividades de enzimas do *downstream* da via de fenilpropanóides, como sintases de chalcona (CHS), desidrogenases de álcool cinâmico e a própria POX poderia ter promovido um efeito de dreno sobre os substratos fenólicos solúveis. Como evidência, em banana desafiada com *Pseudomonas fluorescens* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, foi observada uma redução no conteúdo de fenólicos, após um aumento proeminente na atividade de POX, e redução da atividade de PAL (Thangavelu et al., 2003). Em pimenta inoculada com um isolado galiciano de *Phitophthora capsici* (Gayoso et al., 2004), a despeito do aumento de compostos fenólicos nas folhas, foram relatados menores valores de compostos fenólicos totais em tecidos onde foram verificados picos de atividade de POX, em similaridade com dados relatados no presente trabalho. Naturalmente mais investigações devem ser feitas para elucidar as causas da redução de fenóis totais nas plantas tratadas.

Plantas respondem a patógenos com a ativação de uma rede de respostas inatas que pode ser expressa localmente, no sítio de infecção de invasão do patógeno, bem como sistemicamente, em tecido ainda não infectado (Maleck e Lawton, 1998). Quitinases e glucanases de planta participam de sistemas de



defesa com fatores de hidrólise sobre componentes de parede celulares fúngicas e bacterianas, e têm uma importante função dentro do arsenal de contra-ataque das plantas. Quitinases de planta prontamente liberam oligômeros de quitina a partir de segmentos de parede celular fúngica, além de possuir atividade lisozímica sobre paredes celulares bacterianas, sugerindo uma evidência indireta de atividade antibacteriana da enzima (Schlumbaum et al., 1986; Herget et al., 1990; Stintzi et al., 1993). Existem também relatos de endoquitinases purificadas processando atividade lisozímica e hidrolizando ligações  $\beta$ -1,4 entre N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, dentro em peptidoglicanos de parede celular bacteriana (Majeau et al., 1990). Resultados de CHI e GLU induzidas pelos tratamentos estudados em folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada reforçam que, além de sua aplicação no controle de doença causada por bactéria, tais químicos, formulação e extratos naturais poderiam ser aplicados também buscando controlar doenças causadas por fungos.

## 7 CONCLUSÕES

Em conclusão, os tratamentos investigados no presente trabalho são, em maior e menor nível, efetivos na proteção do tomateiro susceptível contra infecção bacteriana causada por um isolado virulento de *Xanthomonas vesicatoria*.

Tratamentos com os melhores percentuais de proteção, '20% MCp', '30% VLA', ASM e Ecolife®, mostraram respostas de indução de resistência. Essas respostas de redução de progresso de doença parecem estar associadas com a mobilização de defesa bioquímica da planta, evidenciada pelas respostas de enzimas relacionadas à patogênese, como POX, CHI, GLU, PPO e PAL, e deposição significativa de lignina em tecidos foliares.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANFOKA G. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Vollendung) to cucumber mosaic virus. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, p. 401-405, 2000.
- ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct. 2002.
- BÉCOT, S.; PAJOT, E.; CORRE, D. L.; MONOT, C.; SILUÉ D. Phytogard® (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, p. 417-425, 2000.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, Dec. 1998.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, Berlin, v. 204, n. 2, p. 153-168, Feb. 1998.
- BEN-SHALON, N.; AKI, C.; ARDI, R.; PINTO, R. Elicitation effects of chitin oligomers and chitosan sprayed on the leaves of cucumber (*Cucumis sativus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Israel Journal of Plant Sciences**, Gival Shaul, v. 50, n. 3, p. 199-206, 2002.
- BOUDET, A. M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, n. 2, p. 67-71, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley & Sons, 1990. 532 p.

- CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist*, Cambridge, v. 163, n. 3, p. 563-571, Sept. 2004.
- CHÉRIF, M.; BÉLANGER, R. R. Use of potassium silicate amendments in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on long English cucumber. *Plant Disease*, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1008-1011, Oct. 1992.
- COLE, D. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection*, Oxford, v. 18, p. 267-273, 1999.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.
- EPSTEIN, E. Silicon in plants, facts vs. concepts. In: SILICON AGRICULTURE CONFERENCE, 1., 1999, Fort Lauderdale. *Proceedings....* Fort Lauderdale, Florida: University of Florida, 1999.
- FAWE, A.; ABOU, Z. M.; MENZIES, J. G. BELÁNGER, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology*, Oxford, v. 88, n. 5, p. 396-401, May 1998.
- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Analytical Biochemistry*, Washiongtion, v. 215, n. 1, p. 59-65, Nov. 1993.
- GAYOSO, C.; POMAR, F.; MERINO, F.; BERNAL, M. A. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 1-13, Oct. 2004.
- GODARD, J. F.; ZIADI, S.; MONOT, C.; CORRE, D. L.; SILUÉ, D. Benzothiadiazole (ASM) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection*, Oxford, v. 18, n. 6, p. 397-405, July 1999.
- HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 55, n. 2, p. 77-84, Aug. 1999.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 177-193, 2003.

HE, C. Y.; HSIANG, T.; WOLYN, D. J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 225-230, Apr. 2002.

HEATH, M. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 315-319, Aug. 2000.

HERGET, T.; SCHELL, J.; SCHREIER, P. H. Elicitor-specific induction of one member of the chitinase gene family in *Arachis hypogaea*. **Molecular General and Genetics**, New York, v. 224, n. 3, p. 469-476, Dec. 1990.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA, USA: California Agricultural Experiment Station, University of California, 1950.

HORTOIS, D. , LINEBACK, D. R. Chitosan from chitin. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 403-406, 1965.

HWANG, B. K.; SUNWOO, J. Y.; KIM, Y. J.; KIM, B. S. Accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, n. 5, p. 305-322, Nov. 1997.

KADO; HESKETT. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, pseudomonas and xanthomonas. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 96-97, June 1970.

KESSMAN, H. T.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-459, 1994.

KNUDSON, L. L.; TIBBITS, T. W.; EDWARDS, G. E. Measurements of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. **Plant Physiology**, Rockville, v. 60, n. 4, p. 606-608, Oct. 1977.

LA CAMERA, S.; GOUZERT, G.; DHONDT, S.; HOFFMAN, L.; FRITIG, B.; LEGRAND, M.; HEITZ, T.; Metabolic reprogramming in plant immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipins pathways. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 98, p. 267-281, Apr. 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, J.; ZINGEN-SELL, I.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by 3-aminobutyric acid and methyl jasmonate. **Journal of Plant Disease Protection**, v. 103, p. 288-299, 1996.

MALECK, K.; LAWTON, K. Plant strategies for resistance to pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, Clare, v. 9, n. 1, p. 208-213, 1998.

MAJEAU, N.; TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. **Plant Science**, Cclare, v. 68, n. 1, p. 9-16, 1990.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 551-565, July 2002.

MENZIES, J.; BOWDEN, P.; PRET, D.; GLASS, A. D. Foliar applications of potassium silicate reduce severity of powdery mildew on cucumber, muskmelon, and zucchini squash. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 6, p. 902-905, Nov. 1992.

MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. v. 1, p. 113-158.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 2, p. 355-360, Jan. 2001.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate Immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 318-324, Aug. 2002.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, Oct. 2002.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S.; RAJA, D. P. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 66, n. 2, p. 235-240, Aug. 1999.

SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VÖGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, London, v. 324, n. 6095, p. 365-367, Nov. 1986.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 17-127, 1977.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July 1990.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 605-610, Dec. 1997.

THANGAVELU, R.; PALANISWAMI, A.; DORAISWAMY, S.; VELAZHAHAN, R. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* on induction of defense enzymes and phenolics in banana. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 107-112, 2003.

TOWBIN, H.; STAEBENLIN, T.; GORDON, J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: produces and some application. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrilamide gel eletrophoresis. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 178, n. 2, p. 362-366, 1989.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, Dec. 1990.



## CAPÍTULO 3

### **ATIVIDADES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS EM TOMATEIRO PRÉ-TRATADO COM INDUTORES DE RESISTÊNCIA E INFECTADO POR ISOLADO PATOGENICO DE *Xanthomonas vesicatoria***

## 1 RESUMO

CAVALCANTI, F. R. Atividades de enzimas antioxidantes e respostas fotossintéticas em tomateiro pré-tratado com indutores de resistência e infectado por isolado patogênico de *X. vesicatoria*. In: \_\_\_\_. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos**. 2005. Cap. 3, p. 92-123. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A habilidade de acibenzolar-S-metil (ASM) e extratos naturais em reduzir o progresso da mancha foliar bacteriana preservando os processos fotossintéticos e de trocas gasosas foi investigada, e níveis relativos de tolerância foram considerados. Plantas foram pulverizadas com ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e extratos aquosos, a quente ('30 % VLA') e a frio ('30 % VLAf'), provenientes de pó de tecido de *S. lycocarpum* infectado por *C. pernicioso*. Com isso, foi avaliada a competência das plantas tratadas em aumentar as atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo de alívio oxidativo, tais como dismutases de superóxido (SOD), catalases (CAT), peroxidases de ascorbato (APX). O contexto metabólico desses aumentos de atividade foi discutido. Plantas foram pulverizadas com os extratos e, 4 dias após, foram desafiadas por um isolado virulento de *X. vesicatoria*. Experimentos de quantificação de doença confirmaram que plantas pré-tratadas reduziram efetivamente o progresso da doença causada pela bactéria. Diferenças significativas entre plantas tratadas e não tratadas refletiram-se nos indicadores de trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila a. Plantas tratadas com água e inoculadas (controle) mostraram decremento na assimilação de  $\text{CO}_2$ , taxa de transpiração, condutância estomática e taxa fotossintética. Eficiência do uso de água e eficiência de carboxilação foram também fortemente afetadas em plantas controle, em comparação com as plantas pré-tratadas, que mantiveram patamares encontrados na testemunha sadia. ASM e extratos naturais induziram em plantas efetivo aumento de atividade nas enzimas estudadas somente após 48 horas, sugerindo uma participação enzimática na mitigação oxidativa e redução do desnível fotossintético imposto pela expansão da lesão, em um relativo componente de tolerância acrescentada à resistência induzida pelos tratamentos estudados.

---

\* Comitê de Orientação: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAVALCANTI, F. R. Antioxidant enzyme activities and photosynthetic responses in tomato infected by a pathogenic *X. vesicatoria* strain and pre-treated by chemical and natural resistance inducers. In: \_\_\_\_\_. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos**. 2005. Cap. 3, p. 92-123. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

The ability of chemical and natural extracts to reduce bacterial leaf spot and keep up photosynthetic processes was investigated, and the relative levels of tolerance evaluated. Plants were sprayed with acibenzolar-S-metil (0.2 mg ASM/mL) and aqueous extracts from flour of witches broom infected tissue ('30% VLA' and '30% VLAF') from necrotic branches of *Solanum lycocarpum*. Further, the competence of treated plants to enhance activities of main antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), phenol peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX) was measured as well. Plants were sprayed with treatments and, 4 days after pulverizations, were challenged with a virulent *Xanthomonas vesicatoria* strain. Disease assessment experiments confirmed that pre-treated plants showed effective reduction of bacterial lesion. Significant differences between treated and not treated plants regarding gas exchange photosynthetic indicators and chlorophyll a fluorescence parameter were observed. Infected not treated plants showed decreased CO<sub>2</sub> assimilation, transpiration rate, stomatal conductance and photosynthetic rate. Water use efficiency and carboxylation efficiency were also strongly affected in infected plants and maintained at healthy plant level in pre-treated plants. ASM and natural extracts did induce effective increase in all antioxidant enzyme activities only after 48 hours, showing typical response of delayed enzymatic reaction from an compatible plant-pathogen interaction. Our results suggests that increased antioxidant enzyme activities might play an oxidative mitigation role on reduction of photosynthetic unbalance imposed by expansion of bacterial lesion, in a relative component of tolerance added to established resistance inducted by studied treatments.

---

\* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Adviser); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO GERAL

Quando plantas são atacadas por patógenos, elas podem responder com a ativação de uma variedade de mecanismos de defesa, incluindo a rápida produção e acumulação de espécies ativas de oxigênio (ROS). Geração de ROS é considerada um evento prematuro que pode influenciar fundamentalmente o balanço da interação entre patógeno e hospedeiro (Bolwell, 1999; Gayoso et al., 2004). ROS são predominantemente representados pelo radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ). Essas espécies reativas têm sido descritas como ubíquas em sistemas de defesa de plantas, assim como responsáveis pela iniciação de degradação oxidativa em organelas expostas a estresses bióticos e abióticos (Bolwell, 1999; Cavalcanti et al., 2004). A explosão oxidativa inicial em tecidos de genótipo resistente a doenças lança rapidamente  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  no ambiente celular, os quais participam, em uma interação incompatível planta-patógeno, como mediadores da resposta hipersensitiva (HR) (McDonald et al., 2002). Explosão oxidativa e HR têm sido relatados como tendo associação em morte celular programada (PCD), além de ter envolvimento em muitas modificações fisiológicas e moleculares aparentes em um componente de morte celular imbuída no sistema de defesa vegetal (Richael e Gilchrist, 1999; Neill et al., 2002).

Produção de  $H_2O_2$  leva ao rápido reforço de parede celular, por seu envolvimento com as reações oxidativas de *cross-linking* de monômeros de parede celular, causando, ainda, lançamento de cálcio do vacúolo para a matriz celular, fenômeno este com importância central nos processos de transdução de sinal de defesa (Vanacker et al., 1998). Da mesma forma, a produção de fitoalexinas, enzimas hidrolíticas, PR-proteínas, inibidores de proteases e deposição de lignina e calose em paredes celulares do hospedeiro contribuem em

conjunto para a resistência contra ataque de patógenos (Richael e Gilchrist, 1999).

Plantas possuem uma matriz complexa de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que podem proteger células dos danos oxidativos, por remoção de ROS. Defesas enzimáticas incluem enzimas antioxidantes como as peroxidases de fenóis (POX, EC 1.11.1.7), peroxidases de ascorbato (APX, EC 1.11.1.1), peroxidases de glutatona (GPX; EC 1.11.1.9), dismutases de superóxido (SOD; EC 1.15.1.1) e catalases (CAT; EC 1.11.1.6), as quais podem, juntamente a outras enzimas envolvidas no ciclo do ascorbato-glutatona, promover remoção de ROS (Hernández et al., 2001). POX é amplamente distribuída nas plantas superiores e protege células contra a influência destrutiva do  $H_2O_2$  catalisando sua decomposição em água, através da oxidação de substratos fenólicos (Sudhakar et al., 2001; Lin e Kao, 2002). SOD catalisa a dismutação do  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  e oxigênio molecular. CAT está presente nos peroxissomos de células aeróbicas e ausentes nos cloroplastos (Dionísio-Sese e Tobita, 1998). APX e CAT podem proteger a célula de concentrações desbalanceadas de  $H_2O_2$  catalisando sua decomposição em  $O_2$  e  $H_2O$  (Foyer e Noctor, 2000). O sistema de defesa antioxidante inclui também moléculas antioxidantes, tais como carotenóides, ascorbato, glutatona e tocoferóis (Noctor e Foyer, 1998).

Além dos eventos iniciais de explosão oxidativa e resposta hipersensitiva, reações de resistência sistêmica adquirida (SAR) desenvolvem-se tanto localmente quanto sistemicamente em resposta a patógenos causadores de lesões necróticas, em fenômeno coordenado de indução de resistência (Hammond-Kosack e Parker, 2003). Tal resistência é frequentemente associada à produção de PR-proteínas, em processo mediado via acumulação de ácido salicílico (Durrant e Dong, 2004). Componentes químicos como derivados de acibenzolar-S-metil (ASM), ácido isonicotínico (INA) e metil jasmonato (MeJa)

podem induzir defesa, mimetizando o papel do AS (Hwang et al., 1997). Elicidores bióticos exógenos podem induzir SAR. Elicidores são o sinal de reconhecimento bioquímico inicial, que dispara uma reação de contra-ataque da planta contra invasões por microrganismos patogênicos. Ao lado dos ativadores químicos e elicidores específicos, a pesquisa tem demonstrado que plantas podem envolver reconhecimento por numerosos componentes derivados da superfície de microrganismos, capazes de promover aumento de resistência em hospedeiros e não hospedeiros. Tais elicidores incluem glicoproteínas, peptídeos, lipídeos e carboidratos fragmentados de paredes celulares, advindos tanto de planta quanto de patógenos, ocasionalmente concentrados e experimentados em extratos naturais e filtrados (Benhamou et al., 1998; Ben-Shalon et al., 2002; Heath, 2000; Bautista-Baños et al., 2003).

Resultados em estudo preliminar mostraram que ASM e extratos aquosos provenientes de pó de tecido necrótico de ramos de *S. lycocarpum* infectado por *Crinipellis pernicioso* protegem efetivamente tomateiro susceptível contra a mancha foliar bacteriana. Com isso, o objetivo deste presente estudo, foi determinar quão afetado é o processo fotossintético, em plantas de tomateiro tratadas e não tratadas por ASM e extratos naturais, antes e depois do aparecimento dos sintomas visíveis. Para isto, foram avaliados parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de clorofila a. Ainda, foram avaliadas atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo de alívio oxidativo. Na pesquisa, foi hipotetizado que a presença de ROS em estágios tardios após inoculação com o patógeno, represente muito mais fonte de estresse oxidativo causado pela colonização do patógeno nos tecidos foliares, do que indicação de explosão oxidativa ou HR. Ao mesmo tempo, aumento de atividade de enzimas relacionadas ao alívio oxidativo, poderia indicar um ganho de tolerância oxidativa por parte das plantas tratadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal e condições de crescimento. Manutenção e inoculação do isolado de *X. vesicatoria*

Em experimentos de proteção de planta, conduzidos em casa de vegetação, plântulas de tomate cv. Santa Cruz Kada, susceptíveis à mancha foliar causada por *Xanthomonas vesicatoria*, foram mantidas em recipientes de 3L em substrato composto de areia, matéria orgânica seca e vermiculita (2:1:1). O experimento, neste caso, foi delineado em DBC, com 5 blocos, sendo considerada como unidade experimental um recipiente contendo 4 plantas.

Para experimentos de coleta de tecido foliar fresco, sementes de tomate, cv. Santa Cruz Kada, foram imersas em EtOH 1% v/v e hipoclorito de sódio 0,1% v/v, por 1 minuto e, então, lavadas com água destilada e germinadas em recipientes de 400 mL, contendo areia textura média exaustivamente lavada e esterilizada. Após emergência, as plântulas foram regadas diariamente com 1/10 da solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com média de temperatura dia/noite de 31/24°C, umidade relativa de 43/85%, fotoperíodo de 12 horas, aproximadamente, e uma média de densidade máxima de fluxo de fótons de 310-400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medidos ao nível da planta (IRGA modelo LCA-4, Hoddesdon, UK). O experimento foi instalado em DBC, com 3 blocos e 1 unidade experimental com um recipiente de 400 mL, contendo 1 única planta.

Um isolado virulento de *Xanthomonas vesicatoria* foi mantido em ágar dextrose-nutriente (NYA), em câmara de crescimento regulada em 4°C após isolamento, a partir de material infectado e ulterior confirmação por testes químicos. Inóculo foi preparado a partir de células situadas na fase *log* inicial, as quais foram obtidas pelo crescimento do isolado virulento em um meio nutriente

de levedura, incubado a 26°C em um agitador orbital ajustado para 200 rpm, por 12 h. Bactérias foram então concentradas por centrifugação (2x, cada qual a 3000 x g por 5 min), e ressuspensas em água estéril. A concentração foi ajustada pela diluição da suspensão com OD<sub>540</sub> fixada em 0.20 (10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>). 50 mL da suspensão ajustada foram atomizadas em folhas de plantas de tomate com 15 dias da sementeira, até o ponto de escorrimento. Imediatamente plantas foram transferidas para uma câmara de incubação com 33/30°C e 95/100 % de umidade relativa, onde permaneceram por 12 h. Em seguida as plantas foram transportadas de volta à casa de vegetação.

#### 4.2 Descrição dos tratamentos

ASM foi fornecido como 50% de ingrediente ativo em uma formulação comercial em grânulo seco. Para pulverizações foliares, um volume suficiente de uma solução foi completado com água destilada para uma concentração final de 0.2 mg ASM mL<sup>-1</sup>.

Tecido caulinar de lobeira (*S. lycocarpum*), arbusto hospedeiro silvestre de *C. pernicioso*, densamente infectado e necrosado por este fungo, foi coletado para secagem a 60°C por 24 horas e posterior trituração seguido de moagem. O sintoma de interesse produzido pela interação patógeno-hospedeiro foi caracterizado pelo superbrotamento de ramos e entrenós, hiperplasia e hipertrofia celular, caracterizando 'vassoura-de-bruxa', em seu estágio de 'vassoura seca'. A pó obtido do tecido necrosado foi armazenado sob refrigeração a 4°C.

120 g do pó obtido foram divididos em 8 alíquotas de 15 g, com cada alíquota sendo ressuspensa em aproximadamente 50mL de água em erlenmeyer de 250mL. Os erlenmeyers foram então dispostos em agitador orbital, onde sofreram agitação de 130rpm durante 5 horas. Em seguida, o extrato foi filtrado a vácuo em sistema funil com novelo de algodão acoplado a um kitazato, para



separação dos resíduos. Por fim, a amostra foi congelada em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso experimental, com o tratamento sendo denominado '30% VLA'.

90 g do pó obtido foram ressuspensos em 300 mL de água destilada e transferidos para um balão volumétrico de 1L. O conjunto recebeu tratamento térmico de  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, em refluxo. Após resfriamento, o extrato foi filtrado a vácuo em sistema funil com novelo de algodão acoplado a um kitazato, para separação dos resíduos. Após o resfriamento, a amostra foi congelada em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso experimental, com o tratamento sendo denominado ('30% VLA').

#### **4.3 Coleta de material fresco para determinações enzimáticas**

Plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada, 15 dias após semeadura, foram pulverizadas com '30% VLA'; '30% VLA' e ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) até o ponto de escorrimento. Plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água (controle) foram coletadas em 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após pulverizações (HAP), continuando em 3, 6, 9 e 12 dias após as pulverizações (DAP). Tratamentos pulverizados e inoculados foram coletados somente em 6, 9 e 12 DAP. A inoculação com a suspensão de Xv foi conduzida 4 DAP em plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água destilada. Antes de cada coleta, às 9:00 h, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento ajustada para  $27^{\circ}\text{C}$ , 75 % de umidade relativa e  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de densidade de fluxo de fótons, por 1 hora. Em seguida, as folhas foram coletadas, homogeneizadas e amostradas, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente utilizadas para determinações bioquímicas.

#### **4.4 Determinações enzimáticas**

Material foliar foi homogeneizado por meio de almofariz e pistilo em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo EDTA 0,1 mM durante

5 minutos, sobre um banho de gelo. Após filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 13000 g por 15 min e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. Todos os passos foram executados em 0-4°C. Proteína solúvel contida nos extratos foi aferida pelo ensaio de Bradford (1976), usando um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

Atividade de catalases foi determinada pela adição de 50 µL de extrato enzimático para completar 3 mL de uma solução contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20mM. Após incubação a 30°C por 2 min, foi medido o decréscimo na absorvância a 240 nm (Havir e McHale, 1987). A atividade de CAT foi calculada utilizando-se coeficiente de extinção molar de  $36 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expressa em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidado mgP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. A atividade de dismutases de superóxido foi determinada pela adição, em cavidade de microplaca de 96 poços, de 50 µL do extrato enzimático a uma solução contendo L-metionina 13mM, 75 µL de cloreto de *p*-nitro blue tetrazolium (NBT), 100 µM EDTA e riboflavina 2 µM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. A reação teve lugar em uma câmara densamente iluminada por lâmpada fluorescente de 30 W a 25°C. A reação foi iniciada pela ativação da lâmpada durante 5 min, de acordo com a metodologia de Van Rossun et al. (1997). A formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida pelo aumento da absorvância a 620 nm em um leitor EIA, com filtro compatível. Controles da reação não receberam extrato enzimático. Placas com os brancos receberam a mesma combinação de mistura, porém foram mantidas no escuro. Unidade de atividade SOD (UA) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para 50 % de inibição da fotorredução do NBT, em comparação com os controles. A atividade da enzima foi expressa em UA mgP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Atividade de peroxidases de ascorbato foi determinada pela adição de 100 µL da preparação enzimática para completar 0,5 mL de uma solução contendo ácido ascórbico 0,5 mM diluído em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mM. O

decremento na absorbância a 290 nm foi monitorado no intervalo entre 10 – 180 segundos (Nakano e Asada, 1981, modificado por Koshiba, 1993). Atividade de APX foi determinada em comparação com uma curva padrão de ascorbato (preparada a partir de uma solução-mãe de 1 mM), e expressa como mM de ascorbato (oxidado)  $\text{mgP}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Todas as atividade enzimáticas foram ensaiadas em triplicatas.

Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições nativas, foi ensaiada de acordo com Laemmli (1970), usando-se um gel de separação de 12,5% sobreposto por um gel de empilhamento de 5%. Extratos enzimáticos foram preparados em presença de azul de bromofenol e glicerol, sendo centrifugados em breve rotação antes da corrida. Um volume referente a um valor fixo de 15  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra foi adicionado aos poços do gel de empilhamento. Para revelação de atividade de dismutases de superóxidos no gel foi utilizado 40 mL de uma solução consistindo de uma pastilha de NBT (Sigma, 10mg de reagente por tablete), 4mg de riboflavina e água Milli-Q (q.s.p. 40 mL), de acordo com Martinez et al. (2001). Em seguida o conjunto foi levado para uma câmara iluminada por uma lâmpada fluorescente de 30W, onde recebeu luz direta por 5 minutos. A reação foi interrompida por lavagem com água destilada.

#### **4.5 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a**

Após pulverizações dos tratamentos e inoculação com o patógeno, trocas gasosas e fluorescência da clorofila a foram monitoradas em folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, aos 6, 12 e 18 DAP, sob condições controladas em casa de vegetação (densidade de fluxo de fótons  $310\text{-}400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $28^\circ\text{C}$  e 75 % UR) sempre às 8:00 a.m. Medidas de trocas gasosas foram conduzidas em folhas juvenis marcadas e identificadas. As folhas foram colocadas no interior de uma cubeta com microambiente controlado, onde um pequeno ventilador foi

responsável pela manutenção de um fluxo de ar sobre a cubeta. Um aparelho IRGA (modelo LCA-4, Hoddesdon, UK), registrou dados de taxa de transpiração (E), condutância estomática (GS), taxa fotossintética (A) e CO<sub>2</sub> subestomático (Ci). Eficiência do uso de água foi calculada pela relação A/E, e eficiência de carboxilação foi calculada pela relação A/Ci. Medidas de fluorescência foram conduzidas por uso de um Fluorômetro PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norkfolk, UK), pelo uso do método de saturação de pulso, em outras folhas marcadas, após medidas de trocas gasosas. Fluorescência das clorofilas foi inicialmente impedida por grampos escurecedores, acoplados sobre o limbo foliar, durante 30 min. Imediatamente antes do registro de dados, folhas receberam uma exposição de 10 seg de uma luz actínica, de 270  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O rendimento quântico máximo do PSII [ $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ ] e a fluorescência mínima  $F_o$  foram quantificados.

#### 4.6 Delineamento experimental e métodos estatísticos

Delineamento em blocos casualizados foi utilizado nos experimentos de quantificação de doença e experimentos de época de coleta de material vegetal, envolvendo plantas tratadas (pulverizadas), plantas tratadas e inoculadas; testemunhas (controles) pulverizadas com água e pulverizadas com água e inoculadas. Estatística descritiva, análise de variância, testes F e Tukey ao nível de significância de 5 % foram conduzidos utilizando-se o procedimento *general linear model* (GLM) do SAS (*Statistical Analysis System Inc.*, Cary, NC, USA). Quando efeitos de tratamentos foram diferentes ( $P < 0,05$ ), médias foram comparadas pelo teste t de Student (mínima diferença significativa), com o auxílio do SISVAR (© Daniel Furtado Ferreira, 2003), aos níveis de significância de 0,1, 1 e 5 %.

## 5 RESULTADOS

Confirmando resultados dos experimentos de quantificação de doença realizados previamente, tratamentos foram novamente efetivos na redução de área lesionada por *Xv* em folhas de tomateiro susceptível. Percentagens de proteção induzidas por ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), '30 % VLAF' e '30 % VLA' atingiram valores de 45,5 %, 42,1 % e 30,6 %, respectivamente, em um total de 6 avaliações realizadas. Plantas pulverizadas com os tratamentos mostraram em todas as avaliações uma menor severidade de doença, em comparação com o controle pulverizado com água e inoculado. Sintomas iniciais de mancha foliar surgiram, da mesma forma que em experimentos anteriores, cerca de 48 h após a inoculação. Nenhum dos tratamentos influenciou negativamente a fisiologia da planta, em termos de crescimento relativo e acúmulo de massa na parte aérea.

Foi observado um rápido decréscimo nas atividades de SOD e CAT em folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada (Fig. 1) tratadas. Plantas pulverizadas com ASM e '30 % VLA', mostraram decréscimo significativo na atividade de SOD, logo a 1 HAP, mantendo patamares menores em torno 1,5 vezes em relação à testemunha sadia até 12 h, onde se seguiu uma visível recuperação (Figs. 1D e 1F). Plantas inoculadas com *Xv* confirmam uma menor diferença com relação às testemunhas sadias, no entanto, sem atingir os patamares das plantas tratadas com ASM e '30% VLA' (Figs. 1B e 1E). Também considerando o tempo de avaliação em horas, plantas tratadas com '30 % VLA' mostraram um oscilante decréscimo nos valores de atividade de CAT, sustentado por 12 h, incluindo uma queda proeminente exatamente em 12 HAP, quando valores de atividade das testemunhas não inoculadas e pulverizadas com água (sadias) atingiram aproximadamente 5 vezes o valor das plantas tratadas por '30 % VLA' (Fig. 1A).

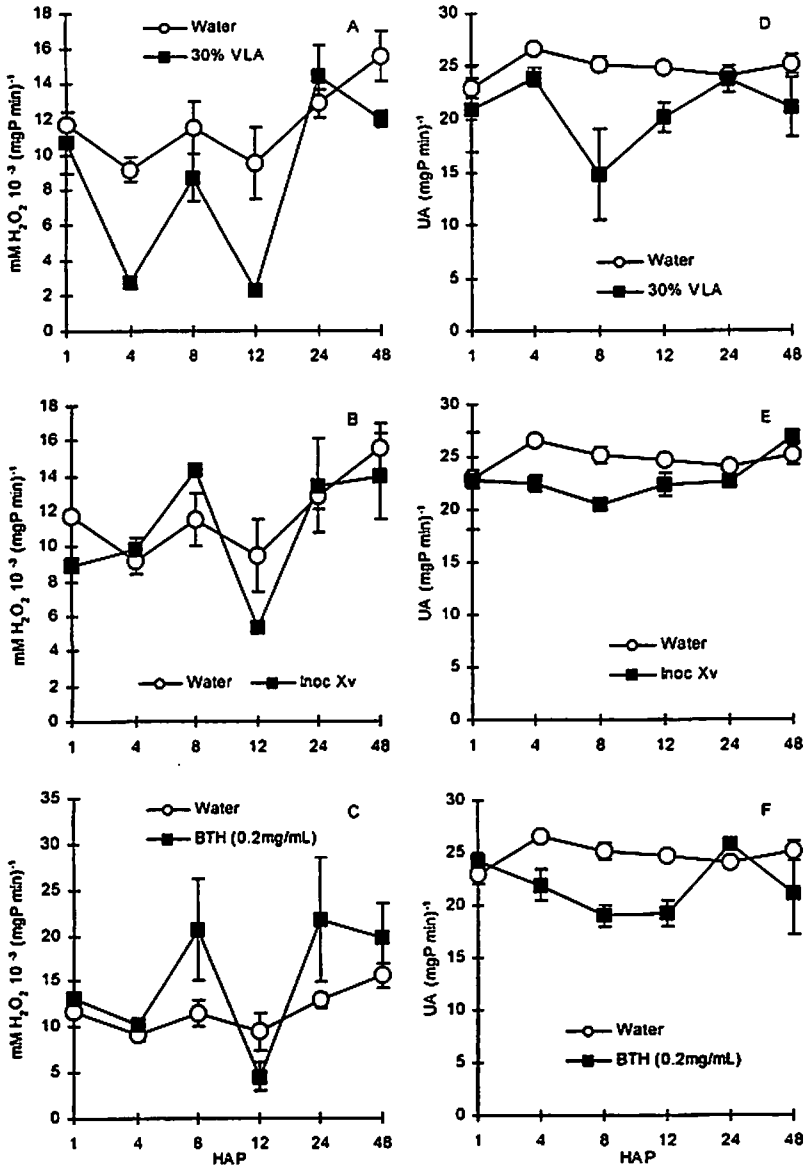


FIGURA 1. Estágios iniciais de atividades de (A, B e C) catalases (CAT) e (D, E e F) dismutases de superóxido (SOD) em folhas de tomate susceptível a Xv, após tratamentos com A, D. '30 % VLA'; B, E. inoculação com Xv; C, F. ASM. Respostas enzimáticas foram avaliadas 1, 4, 8, 12, 24 e 48 HAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Após 12 h, seguiu-se a recuperação e aumento das atividades de CAT e SOD nas mesmas plantas. Plantas tratadas por ASM revelaram ténue incremento na atividade de CAT logo a 1 HAP, brutalmente interrompido por uma queda em 12 HAP (Fig. 1C). Plantas inoculadas não mostraram tendências claras, em relação à testemunha pulverizada com água (sadia), entretando também nestas plantas foi observada uma discreta queda na atividade a 12 HAP. Respostas horárias de atividade de APX não foram medidas, porém pré-ensaios não revelam diferença visível entre plantas pulverizadas com água e plantas tratadas com ASM/VLA, nas primeiras HAP. Experimentos complementares devem ser conduzidos para confirmar resultados de atividade de APX em HAP.

Com relação ao pré-tratamento com ASM e '30 % VLA', após 48 h, respostas de atividades de enzimas relacionadas ao alívio oxidativo, em plantas tratadas e plantas tratadas e inoculadas, revelaram tendência de aumento em relação às testemunhas pulverizadas com água, e pulverizadas com água e inoculadas (Fig. 2). Apesar de uma diferença significativa em 9 DAP, plantas tratadas por ASM/VLA, e tratadas por ambos e inoculadas com Xv mostraram uma tendência significativamente maior dos valores de atividade de SOD, em comparação com as testemunhas pulverizadas com água, e pulverizadas com água e inoculadas (Figs. 2E e 2F). Plantas tratadas com ASM e '30 % VLA' mostraram significativos aumentos também em valores de atividade de CAT (Figs. 2C e 2D). Respostas de CAT em plantas tratadas com '30 % VLA' decresceram levemente a partir de 6 DAP, quando atingiram um pico 2 vezes o valor do controle pulverizado com água. De maneira diferente, ASM induziu aumento a partir de 6 DAP em plantas tratadas e não inoculadas. Plantas tratadas com '30 % VLA' mostraram respostas efetivas de atividade APX, iniciadas em 3 DAP (Fig. 2A), em contraste com plantas tratadas com ASM, cujas atividades não diferiram dos controles pulverizados com água.

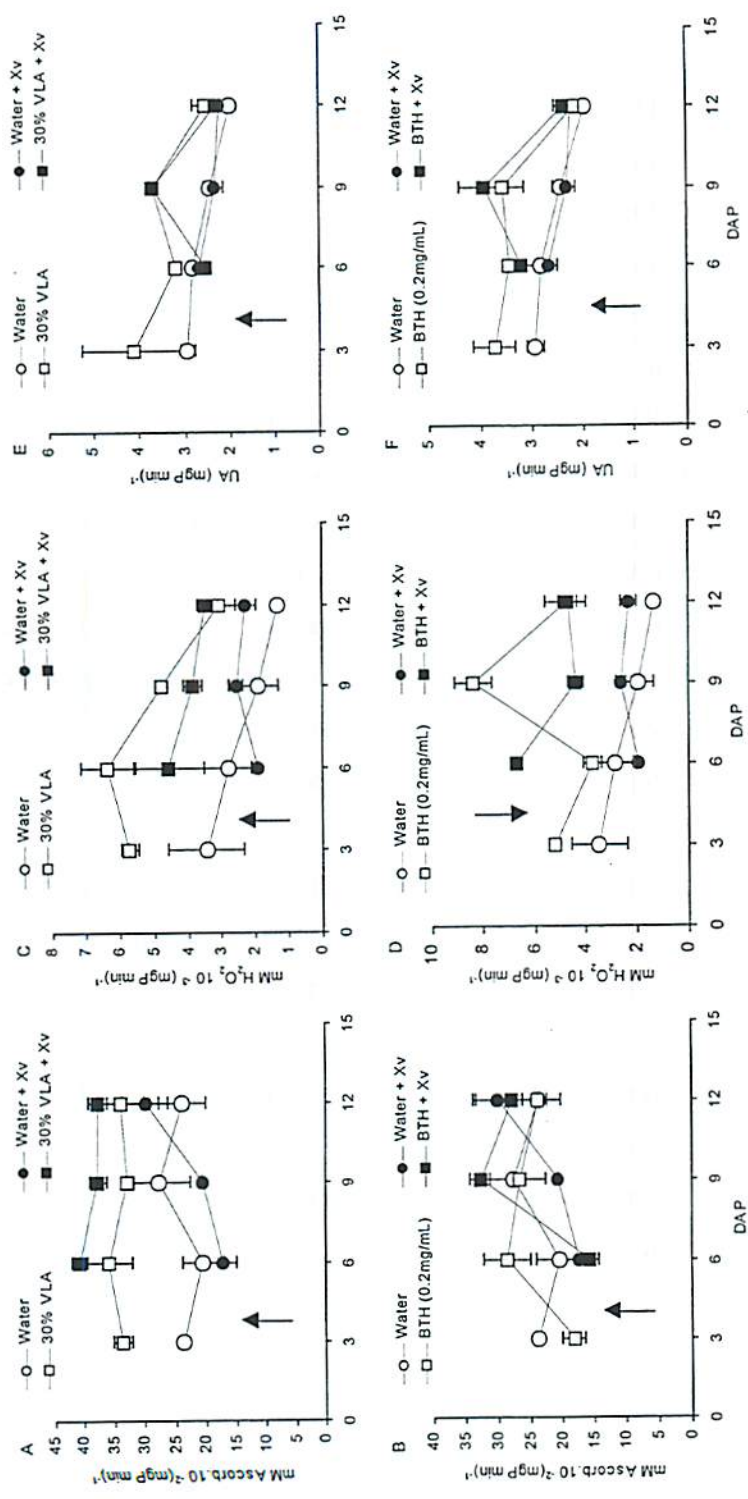


FIGURA 2. Atividades de (A e B) peroxidases de ascorbato (APX); (C e D) catalases (CAT); (E e F) dismutases de superóxido (SOD) em folhas de tomate suscetível a Xv, após tratamentos com A, C, E, 30% VLA; B, D, F. ASM. Setas indicam inoculação com Xv em 4 DAP. Respostas enzimáticas foram avaliadas 3 (apenas plantas tratadas), 6, 9 e 12 DAP (plantas tratadas e inoculadas). Barras de erros indicam o desvio padrão.



Para investigar os mecanismos pelos quais a infecção impede taxas máximas de fotossíntese, níveis de clorofila foram determinados comparativamente em plantas tratadas e controles. '30 % VLA' e ASM preservaram significativamente valores maiores de clorofila a (11,9/10,6 e 10,8/9,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , plantas inoculadas e não inoculadas, na ordem) em comparação com testemunhas inoculada (8,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e não inoculada (7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pulverizadas com água, respectivamente. Resultados de clorofila b mostram um perfil similar, exceto por uma elevada resposta em controles pulverizados com água e inoculados. Em termos de carotenóides, tanto plantas tratadas e não tratadas mantiveram patamares similares. Plantas desafiadas com Xv, não pré-tratadas com ASM/VLA, tiveram significativos valores menores de taxa de respiração (E) e condutância estomática (gs) (Tabela 1); taxa fotossintética (A) e  $\text{CO}_2$  subestomático ( $C_i$ ) (Tabela 2); eficiência do uso de água (EUA) e eficiência de carboxilação (EC) (Tabela 3); eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) e fluorescência mínima ( $F_o$ ) (Tabela 4) a 6, 12 e 18 DAP.

Revelação em gel de enzimas relacionadas à patogênese de SOD (Fig. 3), mostrou 4 isoformas constitutivas de SOD, não tendendo a confirmar, entretanto, aumento de atividade específica em plantas submetidas aos tratamentos estudados, obtido por ensaio colorimétrico. Nenhuma isoforma discrepante foi evidenciada em plantas '30 % VLA' e ASM.

Resultados de trocas gasosas e eficiência da clorofila comprovam que ASM e '30 % VLA' reforçam a manutenção das plantas desafiadas em um *status* fotossintético comparável à planta sadia, seguindo certo padrão de menor estresse causado pelo avanço da mancha bacteriana.

Tabela 1. Efeitos dos tratamentos sobre a taxa de transpiração (E) e condutância estomática (gs) em folhas de tomateiro susceptível a Xv 6, 12 e 18 DAP inoculadas com um isolado virulento de *X. vesicatoria*

<sup>1</sup> Tratamentos	Taxa de transpiração - E (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )			Condutância estomática - gs (cmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		
	<sup>2</sup> Dias após pulverizações (DAP)					
	6	12	18	6	12	18
Água + Xv	1,22 ± 0,07 Ba	0,57 ± 0,06 Bb	0,86 ± 0,02 Bab	5,5 ± 0,50 Bb	3,0 ± 0,02 Ac	8,5 ± 0,50 Ba
Sadia	1,93 ± 0,06 Aa	0,74 ± 0,02 ABc	1,22 ± 0,06 Ab	8,0 ± 0,01 ABa	3,1 ± 0,10 Ab	8,5 ± 0,51 Ba
ASM 0,2 mg/mL	1,89 ± 0,01 Aa	0,85 ± 0,04 Ab	0,93 ± 0,04 ABb	8,5 ± 0,60 Aa	3,0 ± 0,00 Ab	9,0 ± 0,02 Ba
30% VLA	1,92 ± 0,00 Aa	0,82 ± 0,06 ABb	1,01 ± 0,07 ABb	8,0 ± 0,05 ABb	2,5 ± 0,50 Ac	12,5 ± 0,40 Aa
30% VLAF	1,84 ± 0,17 Aa	0,77 ± 0,06 ABb	0,96 ± 0,03 ABab	7,5 ± 0,50 ABab	3,5 ± 0,52 Ab	11,5 ± 0,50 ABa

<sup>1</sup> ASM e extratos naturais foram pulverizados nas folhas 15 d após semeadura, e plantas foram inoculados com *X. vesicatoria* strain 5 DAP.

<sup>2</sup> Dentro de cada dia (colunas), valores com as mesmas letras maiúsculas não possuem diferença significativa ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey. Entre dias (linhas), valores com as mesmas letras minúsculas não diferem significativamente ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 2. Efeitos dos tratamentos sobre a taxa de fotossíntese (A) e CO<sub>2</sub> subestomático (Ci) em folhas de tomateiro susceptível a Xv 6, 12 e 18 DAP inoculadas com um isolado virulento de *X. vesicatoria*

<sup>1</sup> Tratamentos	Taxa fotossintética - A (µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )			CO <sub>2</sub> subestomático - Ci (µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		
	<sup>2</sup> Dias após pulverizações (DAP)					
	6	12	18	6	12	18
Água + Xv	4,18 ± 0,79 Ba	3,10 ± 0,72 Bb	3,10 ± 0,34 Bb	190,75 ± 20,7 Aa	151,70 ± 6,5 Ca	250,60 ± 6,6 Aa
Sadia	7,14 ± 0,57 Aa	8,04 ± 0,60 Aa	5,91 ± 0,24 Aab	230,40 ± 2,5 Aa	213,10 ± 11,2 Aa	200,30 ± 4,9 Ba
ASM 0,2 mg/mL	7,44 ± 0,11 Aa	6,98 ± 0,84 ABa	7,45 ± 0,43 Aa	208,30 ± 6,2 Aa	203,00 ± 2,9 Aa	203,70 ± 7,2 Ba
30% VLA	6,26 ± 0,46 Aa	6,51 ± 0,29 ABa	7,88 ± 0,82 Aa	222,05 ± 1,2 Aa	207,40 ± 6,0 Aa	255,50 ± 3,3 Aa
30% VLAF	5,74 ± 0,02 Ab	7,97 ± 0,14 Aa	6,99 ± 0,29 Aab	220,80 ± 3,9 Aa	183,50 ± 5,6 Ba	246,60 ± 1,7 Aa

<sup>1</sup> ASM e extratos naturais foram pulverizados nas folhas 15 d após semeadura, e plantas foram inoculados com *X. vesicatoria* strain 5 DAP.

<sup>2</sup> Dentro de cada dia (colunas), valores com as mesmas letras maiúsculas não possuem diferença significativa ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey. Entre dias (linhas), valores com as mesmas letras minúsculas não diferem significativamente ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 3. Efeitos dos tratamentos sobre a eficiência do uso de água (EUA) e eficiência de carboxilação (EC) em folhas de tomateiro susceptível a Xv 6, 12 e 18 DAP inoculadas com um isolado virulento de *X. vesicatoria*

<sup>1</sup> Tratamentos	Eficiência do uso de água – EUA ( $10^{-3}$ adim.)			Eficiência de carboxilação – EC ( $10^{-2}$ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{vpm}^{-1}$ )		
	<sup>2</sup> Dias após pulverizações (DAP)					
	6	12	18	6	12	18
Água + Xv	2,92 ± 0,02 Aa	4,26 ± 0,41 Ca	3,49 ± 0,42 Aa	1,7 ± 0,5 Ba	1,8 ± 0,5 Ba	1,2 ± 0,1 Aa
Sadia	5,85 ± 2,01 Aa	11,89 ± 0,10 Aba	9,04 ± 0,04 Aa	4,0 ± 0,2 Aa	3,8 ± 0,1 Aa	3,3 ± 0,2 Aa
ASM 0,2 mg/mL	4,84 ± 0,26 Aa	8,94 ± 0,71 Ba	10,84 ± 2,29 Aa	3,9 ± 0,2 ABa	3,7 ± 0,1 Aa	4,4 ± 0,1 Aa
30% VLA	3,62 ± 0,11 Aa	10,58 ± 0,13 Aba	8,39 ± 2,35 Aa	3,0 ± 0,1 ABa	3,6 ± 0,1 Aa	4,2 ± 1,4 Aa
30% VLAF	4,18 ± 0,61 Aa	14,44 ± 1,16 Aa	7,30 ± 0,53 Aa	2,9 ± 0,3 ABa	3,9 ± 0,2 Aa	2,9 ± 0,1 Aa

<sup>1</sup> ASM e extratos naturais foram pulverizados nas folhas 15 d após semeadura, e plantas foram inoculados com *X. vesicatoria* strain 5 DAP.

<sup>2</sup> Dentro de cada dia (colunas), valores com as mesmas letras maiúsculas não possuem diferença significativa ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey. Entre dias (linhas), valores com as mesmas letras minúsculas não diferem significativamente ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey.

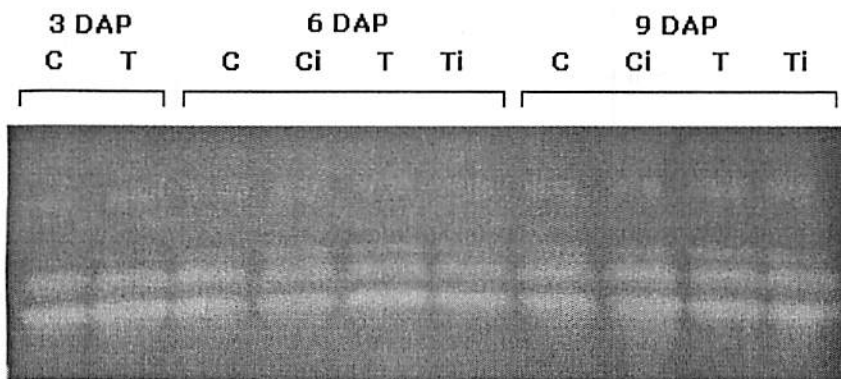
Tabela 4. Efeitos dos tratamentos sobre parâmetros de fluorescência: eficiência máxima do PSII (Fv/Fm) e fluorescência mínima (Fo) em folhas de tomateiro susceptível a Xv 6, 12 e 18 DAP inoculadas com um isolado virulento de *X. vesicatoria*

<sup>1</sup> Tratamentos	Eficiência máxima do PSII – Fv/Fm			Fluorescência mínima - Fo		
	<sup>2</sup> Dias após pulverizações (DAP)					
	6	12	18	6	12	18
Água + Xv	0,728 ± 0,003 Bc	0,798 ± 0,001 Bb	0,850 ± 0,00 ABa	696 ± 48 Aa	564 ± 6 Ba	496 ± 0 Ba
Sadia	0,810 ± 0,005 Aa	0,777 ± 0,004 Bb	0,820 ± 0,014 Ba	577 ± 6 ABa	624 ± 4 Aa	640 ± 20 Aa
ASM 0,2 mg/mL	0,816 ± 0,005 Aa	0,834 ± 0,000 Aa	0,861 ± 0,011 Aa	536 ± 20 Ba	484 ± 18 Ca	449 ± 8 Ba
30% VLA	0,776 ± 0,03 ABa	0,833 ± 0,002 Aa	0,855 ± 0,002 Aa	508 ± 9 Ba	518 ± 19 Ca	480 ± 5 Ba
30% VLAF	0,804 ± 0,01 ABa	0,828 ± 0,008 Aa	0,851 ± 0,05 ABa	513 ± 19 Ba	525 ± 9 BCa	476 ± 2 Ba

<sup>1</sup> ASM e extratos naturais foram pulverizados nas folhas 15 d após semeadura, e plantas foram inoculados com *X. vesicatoria* strain 5 DAP.

<sup>2</sup> Dentro de cada dia (colunas), valores com as mesmas letras maiúsculas não possuem diferença significativa ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey. Entre dias (linhas), valores com as mesmas letras minúsculas não diferem significativamente ao P=0.05 de acordo com o teste de Tukey.

A



B

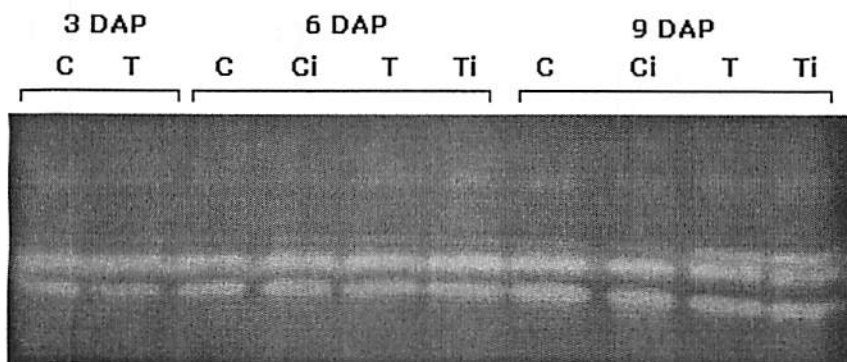


FIGURA 3. Eletroforese em condições nativas revelando isoformas de dismutases de superóxido (SOD) em plantas pulverizadas com A. '30 % VLA' e B. ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Quantidade de proteína por poço:  $15 \mu\text{g}$ . Tempos foram esquematizados 3, 6, 9 e 12 DAP (sadia e tratada, não inoculada). Setas indicam isoformas ativas de peroxidases.

## 6 DISCUSSÃO

Explosão oxidativa e um elevado conteúdo de peróxido de hidrogênio são freqüentemente observados prematuramente após a inoculação de plantas, principalmente em cultivares resistentes. Essas respostas fazem parte de uma via de transdução de sinais que levam à indução de genes de defesa e o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (SAR). No entanto, a explosão oxidativa é usualmente rápida e localizada em células próximas ao sítio de infecção, freqüentemente resultando em uma resposta hipersensitiva, que é caracterizada pela formação de lesões necróticas no sítio de infecção e por restrição do crescimento e dispersão do patógeno (Richael e Gilchrist, 1999; Delledone et al., 2002; Li e Burrit, 2003). Realmente, um número de possíveis funções para ROS tem sido proposto: ataque direto sobre patógenos, envolvimento em mudanças estruturais da parede celular, promoção da morte celular programada (PCD) de células hospedeiras na HR e, como acima mencionado, indução da expressão de genes de defesa (Bolwell, 1999).

Os mecanismos envolvidos na regulação da iniciação, intensidade e duração dessas *explosões* são ainda pobremente entendidos, mas é claro que plantas usam espécies reativas de oxigênio para perturbar o estado *redox* das células e permitir a oxidação controlada que pode causar direta ou indiretamente um efeito antimicrobiano imediato. O possível dano oxidativo causado sobre o metabolismo e sobre a delicada homeostase das células vegetais vai depender da eficiência dos sistemas de defesa antioxidante endógeno (Lamb e Dixon, 1997; Vanacker, 1998; Heath, 1999). De fato, plantas apresentam mecanismo de defesa e utilizam estratégias bioquímicas para regular a sinalização *redox*, bem como para evitar danos causados por ROS. SOD catalisa a dismutação de  $O_2^-$  para  $H_2O_2$  e oxigênio molecular, sendo o peróxido de hidrogênio destruído

predominantemente por APX e CAT. Embora catalases sejam restritas aos peroxissomos e, possivelmente, mitocôndrias, peroxidases de ascorbato têm sido encontradas em todos os compartimentos da célula vegetal (Jimenez et al., 1997). O ácido salicílico é capaz de inibir a enzima catalase. A inibição da catalase induz um aumento na taxa de  $H_2O_2$  citoplasmático, que é formado nas etapas iniciais das respostas de defesa sistêmica das plantas (Vernooij et al., 1994; Ryals et al., 1994). O  $H_2O_2$ , por sua vez, pode ser tóxico diretamente ao patógeno ou atuar na sinalização para expressão de genes relacionados à defesa. Ainda, moléculas antioxidantes, como tocoferóis, carotenóides, ascorbato e glutatona, naturalmente participam de um sistema de alívio oxidativo (Noctor e Foyer, 1998).

Por outro lado, ROS pode também constituir uma mera fonte de estresse oxidativo, em particular, se envolvido em processos primários de estresse, como toxidez iônica e estresse osmótico causado por salinidade ou seca (Cavalcanti et al., 2004), bem como interações compatíveis entre patógeno e hospedeiro (Kwon e Anderson, 2001; Li e Burrit, 2003; Gayoso et al., 2004). Produção exagerada de ROS causa danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Dionísio-Sese e Tobita, 1998), e estratégias antioxidantes são compulsoriamente requeridas para manter a homeostase da célula. Nesse caso, adaptação das plantas a uma condição de infecção estabilizada parece ser talvez muito mais uma resposta de tolerância do que resistência *per se*. Vários estudos, revisados por Akhkhia et al. (2003), indicam que a tolerância pode ser um componente importante da estratégia de sobrevivência de plantas selvagens ao ataque microbiano, ou de herbívoros. Para os autores, uma vantagem clara da tolerância sobre a resistência na estratégia de sobrevivência de um hospedeiro, seria evitar a pressão de seleção sobre a característica de agressividade e virulência de um patógeno.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar respostas das principais enzimas antioxidantes, associadas a respostas de fotossíntese, em termos de trocas gasosas em folhas e alguns indicadores de fluorescência da clorofila a, em plantas saudáveis e infectadas que foram expostas a pulverizações prévias com ASM e extratos naturais. Foi hipotetizado que plantas susceptíveis deveriam mostrar respostas adaptativas e tolerância além da indução de resistência atribuída aos tratamentos estudados, considerando o estresse oxidativo imposto pela infecção demorada e contínua, causada por *Xanthomonas vesicatoria*. Nesse sentido, os resultados observados mostram aparente confirmação da hipótese de tolerância. Houve uma redução nas atividades de SOD promovidas por ASM e '30 % VLA', logo nas primeiras HAP. Em *Phaseolus vulgaris*, foi relatado um aumento da atividade de Cu/Zn-SOD na resposta hipersensitiva de folhas resistentes (Buonaurio et al., 1987). Delledonne et al. (2002), revisaram outros casos envolvendo aumento precoce de SOD e resposta HR. Da mesma forma, o aumento da atividade de CAT de plantas é observado durante a infecção. Há um aumento de expressão de *cat1* de tomateiro, em resposta a *Botrytis cinerea* (Kwon e Anderson, 2001). Aumento de CAT foliar em plantas resistentes de cevada, manifesta-se após 24 h do inóculo de uma raça avirulenta de *Blumeria graminis* (Vanacker et al., 1998).

Em ambos tomateiros tratados e não tratados, as respostas mais fortes de SOD, CAT, APX e SOD, apareceram após 48 h, sugerindo uma situação de atraso na produção de ROS e falha de HR, a despeito do rápido aumento na atividade de POX (Capítulo 2). É hipotetizado que enzimas antioxidantes atuam basicamente a partir de 3 DAP como aliviadores dos ROS gerados pelo aumento dos sintomas da doença, causado pelo avanço da colonização bacteriana em tecidos susceptíveis da cultivar de tomateiro estudada. Apesar disso, investigações conclusivas devem ser feitas para caracterizar HR em folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, sob as condições propostas neste trabalho. É

sugerido, ainda, que um sistema antioxidante ativo deve participar na redução de progresso de doença causada por um patógeno necrotrófico, além da produção de PR proteínas e outras respostas induzíveis de SAR.

A proteção satisfatória de plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada contra mancha foliar bacteriana, por ASM, '30 % VLA' e '30 % VLAF', foi observada em experimentos de quantificação de doença. Os extratos foram preparados como uma suspensão completamente aleatória de moléculas solúveis, incluindo oligossacarídeos fragmentados de parede celular, glicoproteínas, lipídios e um sem-número de resíduos moleculares da interação planta-patógeno. Resistência pode ser induzida em plantas por inoculação por não-patógenos, por endofíticos e por químicos (Reuveni et al., 2000). A quebra de produtos de hidrólise de interação planta-patógenos e/ou componentes de parede de plantas, liberados pela atividade de PR proteínas e ataque de enzimas do patógeno, têm atuado como eliciadores de defesa de planta (Van Loon, 1997). Derivados de acibenzolar-S-metil (ASM) têm sido exaustivamente estudados ao longo dos anos, como um potencial indutor de resistência e promotor de SAR (Louws et al., 2001; Resende et al., 2002). ASM mimetiza o passo do ácido salicílico (Hwang et al., 1997; Cole, 1999).

Durante a fase de colonização da *X. vesicatoria*, em folhas de plantas controle não pulverizadas, a eficiência do uso da água, bem como a eficiência de carboxilação, diminuíram significativamente, em comparação com as plantas tratadas. O progresso da doença pôde ser observado por medidas de trocas gasosas, em uma posição fixa nas plantas. A redução na taxa fotossintética (A) foi certamente devido ao fechamento estomático parcial (gs), ou perda de clorofila a, ou ambos. Uma redução significativa na taxa de transpiração (E) e CO<sub>2</sub> subestomático (Ci) dos controles pulverizados com água e inoculados reforça esta hipótese. Em uma visão geral, quase todos os indicadores de trocas gasosas apontaram uma condição das plantas tratadas por ASM, '30 % VLA' e



'30 % VLAF' equivalente à das plantas saudias, mostrando ainda uma correlação positiva com o incremento na atividade das enzimas antioxidantes. Em feijão-de-corda, o aumento na produção de ROS pode resultar do fechamento estomático, causando uma redução na concentração de CO<sub>2</sub> dentro dos cloroplastos. Isto causa uma diminuição na concentração de NADP<sup>+</sup>, com geração concomitante de ROS (Foyer e Noctor, 2003; Souza et al., 2004; Cavalcanti et al., 2004). Inquestionavelmente, elétrons produzidos por processos fotoquímicos são requeridos por drenos alternativos e este transporte alternativo de elétrons é acelerado quando a fixação de carbono é limitada. Isso é relacionado com a função de proteção nas plantas, tal como a ação de antioxidantes sobre ROS, por exemplo, na fotorrespiração, ou na redução do oxigênio molecular em sítios de redução de organelas (Ribeiro et al, 2003). Uma confirmação simples da proteção fotossintética imposta por ASM e extratos naturais foi evidenciada pelos significativos valores de maior acúmulo de massa de parte aérea, observados em plantas tratadas, comparativamente aos controles pulverizados com água e inoculados. O parâmetro Fv/Fm (rendimento máximo do PSII) em controles pulverizados com água e inoculados foi significativamente mais baixo do que nas testemunhas saudias e nas plantas pré-tratadas e inoculadas, exceto pelos valores relatados em 18 DAP. Estresses que afetam a eficiência do PSII usualmente levam à redução de Fv/Fm, acompanhada por incremento na fluorescência mínima (Fo). Essas alterações possivelmente refletem uma desordem no PSII (Souza et al., 2004).

Como causas dos sintomas e do declínio na capacidade fotossintética, é especulado que injúria oxidativa possa ser causada por toxinas produzidas pela bactéria, ou alguma outra resposta advinda da infecção pelo patógeno. Contudo, investigações envolvendo teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e indicadores TBARS devem ser conduzidas, no intuito de caracterizar mais firmemente o estresse oxidativo.

## 7 CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo confirma a investigação prévia sobre a indução de proteção de tomateiro susceptível por ASM, '30 % VLA' e '30 % VLAF', contra a mancha foliar bacteriana, causada por *Xv*.

Resultados demonstram que os tratamentos contribuem para o relativo incremento, após 48 h, das atividades de enzimas antioxidantes, as quais poderiam ser um importante componente dentro da estratégia de tolerância do tomateiro à infecção bacteriana.

Paralelamente, ASM e extratos naturais induzem, nas plantas, manutenção de um status fotossintético e de trocas gasosas similar àqueles de testemunhas sadias, sendo sugerida uma conexão entre esta manutenção e as respostas enzimáticas de alívio oxidativo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHKHA, A.; CLARKE, D. D.; DOMINY, P. J. Relative tolerances of wild and cultivated barley to infection by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Syn. *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) II- the effects of infection on photosynthesis and respiration. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, n. 6, p. 347-354, June 2003.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNANDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop protection**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 1087-1092, Nov. 2003.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, Berlin, v. 204, n. 2, p. 153-168, Feb. 1998.

BEN-SHALON, N.; AKI, C.; ARDI, R.; PINTO, R. Elicitation effects of chitin oligomers and chitosan sprayed on the leaves of cucumber (*Cucumis sativus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Israel Journal of Plant Sciences**, Givat Shaul, v. 50, n. 3, p. 199-206, 2002.

BOLWELL, G. P. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, n. 4, p. 287-294, Aug. 1999.

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

BUONAURO, R.; TORRE, G. D.; MONTALBINI, P. Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 31, n. 2, p. 173-184, Sept. 1987.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-

stressed cowpea leaves. *New Phytologist*, Cambridge, v. 163, n. 3, p. 563-571, Sept. 2004.

COLE, D. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection*, Oxford, v. 18, p. 267-273, 1999.

DELLEDONE, M.; MURGIA, I.; EDERLE, D.; SBICEGO, P. F.; BIONDANI, A.; POLVERATI, A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 40, n. 6/8, p. 605-610, June /Aug. 2002.

DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, Clare, v. 135, n. 1, p. 1-9, June 1998.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alato, 42:185- 209. 2004.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Tansley Review 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, Cambridge, v. 146, n. 3, p. 359-388, June 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, perxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v. 119, n. 3, p. 355-364, Nov. 2003.

GAYOSO, C.; POMAR, F.; MERINO, F.; BERNAL, M. A. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 1-13, Oct. 2004.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. 14, p. 177-193, 2003.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HEATH, M. The enigmatic hypersensitive response: induction, execution, and role. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 55, n. 1, p. 1-3, 1999.

HEATH, M. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 315-319, 2000.

HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 3, p. 817-831, Nov. 2001.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA, USA: California Agricultural Experiment Station, University of California, 1950.

HWANG, B. K.; SUNWOO, J. Y.; KIM, Y. J.; KIM, B. S. Accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, n. 5, p. 305-322, Nov. 1997.

JIMENEZ, A.; HERNANDEZ, J. A.; DEL RIO, L. A.; SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 1, p. 275-284, May 1997.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, n. 5, p. 713-721, July 1993.

KWON, S. I.; ANDERSON, A. J. Differential production of superoxide dismutase and catalase isozymes during infection of wheat by a *Fusarium proliferatum*-like fungal isolate. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, n. 2, p. 73-81, Feb. 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LI, Z.; BURRIT, D. J.; The influence of *Cocksfoot mottle virus* on antioxidant metabolism in the leaves of *Dactylis glomerata* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 285-295, 2003.

- LIN, C. C.; KAO, C. H. Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 37, n. 2, p. 177-184, June 2002.
- LOUWS, E. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, May 2001.
- MARTINEZ, C. A.; LOUREIRO, M. E.; OLIVA, M. A.; MAESTRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative stress and water stress. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 3, p. 505-515, Feb. 2001.
- MCDONALD, K. L.; SUTHERLAND, M. W.; GUEST, D. I. Temporary hypoxia suppresses the oxidative burst and subsequent hypersensitive cell death in cells of tobacco and soybean challenged with zoospores of incompatible isolates of *Phytophthora* species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 2, p. 133-140, Aug. 2002.
- NAKANO, Y.; ASADA, K.; Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 388-395, Aug. 2002.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.
- NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate Immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 318-324, Aug. 2002.
- REUVENI, R.; DOR, G.; RAVIV, M.; REUVENI, M.; TUZUN, S. Systemic resistance against *Spheroteca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 355-361, June 2000.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO R. M. Induction of resistance in cocoa agains *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, Oct. 2002.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected by *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, n. 3, p. 167-173, Mar. 2003.

RICHAEL, C.; GILCHRIST, D. The hypersensitive response: a case of hold or fold? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 5-12, July 1999.

RYALS, J. A.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 3, p. 1109-1112, Mar. 1994.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGOA, A. M. M. A.; SILVERIA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 45-56, Feb. 2004.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, Clare, v. 161, n. 3, p. 613-619, Aug. 2001.

VANACKER, H.; CARVER, T. L. W.; FOYER, C. H. Pathogen-Induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 3, p. 1103-1114, July 1998.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dodrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

VAN ROSSUN, M. W. P. C.; ALBERDA, M.; VAN DER PLAS, L. H. W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, Clare, v. 130, n. 2, p. 207-216, Dec. 1997.

VERNOOIJ, B.; UKNES, S.; WARD, E.; RYALS, J. Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. **Current Opinion Cell Biology**, London, v. 6, n. 2, p. 275-279, Apr. 1994.



## **CAPÍTULO 4**

### **PROTEÇÃO DO CACAUEIRO CONTRA *Verticillium dahliae* Kleb. POR QUÍMICOS E FORMULAÇÕES NATURAIS, E RESPOSTAS ASSOCIADAS DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA**

## 1 RESUMO

CAVALCANTI, F. R. Proteção do cacaueteiro contra *Verticillium dahliae* Kleb. por químicos e formulações naturais, e respostas associadas de enzimas relacionadas à defesa. In: \_\_\_\_\_. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacaueteiro por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos**. 2005. Cap. 4, p. 124-165. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A eficácia de um extrato metanólico seco e ressuspensão em água ('30% CPM'), bem como um filtrado aquoso ('30% CPA') provenientes de micélio de *Crinipellis pernicioso*; e extrato aquoso a quente ('30% VLA'), e metanólico ('30% VLM'), de tecido necrótico de ramos de lobeira *Solanum lycocarpum* infectado por *C. pernicioso*, na proteção de plantas de cacaueteiro infectado por *Verticillium dahliae* foi avaliada. O potencial de químicos e formulações naturais para redução da murcha vascular em plantas susceptíveis de cacaueteiro foi investigado da mesma forma. Plantas foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil (0,2 mg ASM mL<sup>-1</sup>); com uma formulação natural provenientes de polpa cítrica, conhecida como Ecolife® (5 mL L<sup>-1</sup>); enxofre solúvel (3 g L<sup>-1</sup>); um extrato aquoso a quente de folhas de café infectadas com *Hemileia vastatrix* ('30% EFID'); e peróxido de hidrogênio 200 mM. Todos os tratamentos foram associados ou não a um surfactante, Pentra-Bark® (2,4 mL L<sup>-1</sup>). Em experimento de quantificação de doença, enxofre, '30% EFID', '30% VLA' e Ecolife®, mostraram respostas significativas, atingindo 105%, 104%, 81% e 100% da performance do ASM, respectivamente. Os tratamentos associados ao surfactante mostraram redução de eficiência. Padrões de atividade de peroxidases (POX) e oxidases de polifenóis (PPO) foram alterados em plantas pulverizadas com os tratamentos, e pulverizadas e inoculadas com Vd. Plantas tratadas mostraram discreto aumento na deposição de lignina, aos 13 e 18 DAP, e redução nos valores de fenóis totais, aos 8 e 13 DAP. Exposição das plantas aos tratamentos também promoveu aumento não significativo na atividade de β-1,3-glucanases (GLU) e quitinases (QUI), em folhas, ao longo de 4, 8, 13 e 18 DAP. Neste trabalho, foi sugerido que o aumento nas atividades de enzimas relacionadas à patogênese, bem como a deposição induzida de lignina, indicariam respostas de indução local de resistência, eliciada pelos tratamentos testados.

\* Comitê de Orientação: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

Um tipo específico de RI, a resistência sistêmica adquirida (SAR), desenvolve-se também localizadamente em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica, reação de hipersensibilidade (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico (SA) ou compostos sintéticos como o estér S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotióico (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Neste caso, a resistência geralmente é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), cuja rota de eliciação é mediada pelo ácido salicílico (Hammerschmidt e Smith-Becker, 1999). O metabolismo do SA em plantas ocorre por via da rota dos fenilpropanóides, no qual a fenilalanina é convertida em ácido transcinâmico pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL). Ácido salicílico induz SAR através da sinalização para o acúmulo de PRP's, fitoalexinas e formação de lignina, calose e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, além de papilas em algumas interações fúngicas (Klessig e Malamy, 1994).

A aplicação de compostos como SA, ASM e INA, dentre outros, ativa genes de resistência que codificam para uma série de enzimas oxidativas, como as peroxidases (POX) e polifenoloxidasas (PPO), que contribuem para a formação de barreiras de defesa que reforçam a estrutura celular (Avdiushko et al., 1993). A maioria dessas enzimas tem sido correlacionada com defesa a patógenos em diversas plantas, incluindo fumo, tomate, cucurbitáceas e arroz (Rajappan et al., 1995; Goy et al., 1992).

Diversos trabalhos demonstraram a eficiência do ASM na indução de resistência, com aumento nos níveis de enzimas chaves envolvidas nas respostas de defesa (Anfoka, 2000; Resende et al., 2000). Observou-se que a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo fenólico foi sempre maior em plântulas tratadas com ASM em relação às não tratadas, o que sugere uma provável participação de fenólicos complexos, como a lignina, no processo de defesa,

sendo esta característica também evidenciada em outras interações (Dann e Deverall, 2000). Outras substâncias químicas ou elementos naturais e minerais podem induzir resistência sistêmica em determinadas plantas (Doubrava et al., 1988). Alguns nutrientes podem funcionar como ativadores, co-fatores e reguladores de enzimas, afetando a permeabilidade de membranas, e podem estar envolvidos no controle osmótico, transporte de elétrons e sistema-tampão do protoplasma, participando de diversos eventos fisiológicos essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta e podendo desempenhar importante papel no metabolismo secundário dos vegetais (Marschner, 1995). A importância e o efeito de certos micronutrientes nos processos de resistência parece estar relacionada com sua participação em diversos pontos das rotas metabólicas da síntese de fenóis e lignina (Graham e Webb, 1991).

No presente estudo, foi investigada a eficiência de químicos, de formulação natural (comercialmente conhecida como Ecolife®) e de extratos naturais na proteção do cacaueteiro contra a murcha vascular causada por *Verticillium dahliae*, através de pulverização foliar, antes da inoculação com o patógeno. Tratamentos experimentais foram ASM; Ecolife® (uma formulação natural derivada de polpa cítrica); enxofre solúvel; extratos aquosos de tecido necrótico de *Solanum lycocarpum*, infectado por *C. perniciosa*, e de tecido foliar de cafeeiro densamente infectado por *Hemileia vastatrix*, além de filtrado de micélio de *Crinipellis perniciosa*. Todos os tratamentos foram associados ou não a um surfactante Pentra-Bark®. Adicionalmente, marcadores fisiológicos de indução de resistência, tais como enzimas relacionadas à defesa (PPO), PR-proteínas (POX, GLU e CHI), deposição de lignina, fenólicos totais e pigmentos fotossintéticos foram avaliados nos tratamentos mais eficientes para redução de progresso de doença.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal e condições de crescimento

Em experimentos de proteção de planta, conduzidos em casa de vegetação, seleção de sementes de cacauero susceptível à murcha vascular causada por *Verticillium dahliae*, provenientes de SIAL 70 (CEPLAC, Linhares-ES), foi pré-germinada em vermiculita durante 5 dias e semeada em sacos de polietileno contendo substrato à base de areia, esterco curtido e solo, na proporção 1:1:1, recebendo adubação suplementar aos 30 e 60 dias após a germinação, com NPK (4-14-8), e irrigação diária. Dois experimentos similares (A e B), neste caso, foram delineados em DBC, com 3 blocos, sendo considerado como unidade experimental, a parcela composta por 14 plantas.

Para experimentos de coleta de tecido foliar fresco, seleção de sementes de cacauero susceptível à murcha vascular, também provenientes de SIAL 70, foi pré-germinada em vermiculita e semeada em bandejas de polipropileno, com células de 500mL, em substrato Plantmax®. Após 7 dias da transferência, as plântulas foram regadas diariamente com 1/4 da solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com média de temperatura dia/noite de 31/24°C, umidade relativa de 43/85%, fotoperíodo de 12 horas, aproximadamente, e uma média de densidade máxima de fluxo de fótons de 310-400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medidos próximo à planta (IRGA, modelo LCA-4, Hoddesdon, UK). O experimento foi instalado em DBC, com 3 blocos e 1 unidade experimental com uma célula de 500mL, contendo 1 única planta.

## 4.2 Descrição dos tratamentos

Da mesma forma como feito nos experimentos de tomateiro (Capítulo 2), ASM foi fornecido como 50% de ingrediente ativo em uma formulação comercial em grânulo seco. Para pulverizações foliares, um volume suficiente de uma solução foi completado com água destilada para uma concentração final de 0.2 mg ASM mL<sup>-1</sup>. Ecolife®, um produto comercial originado de polpa cítrica, foi fornecido por Quinabra S.A. (Química Natural Brasileira, São José dos Campos, SP, Brasil), teve sua dose fixada em 1,5 mL Ecolife® L<sup>-1</sup>, em um volume suficiente para as pulverizações completado com água destilada. Enxofre solúvel foi fornecido em pó seco, a partir de um produto comercial, sendo a dose fixada em (3 g L<sup>-1</sup>). Peróxido de hidrogênio 32% (v/v) P.A. foi diluído, em um volume final adequado, para 200 mM, sendo esta dose máxima limite para evitar fitotoxidez, confirmada em ensaios preliminares.

Filtrado aquoso de micélio de *Crinipellis pernicioso* ('30% CPA') obtido a partir do cultivo em caldo nutriente; frações heterogêneas de quitosana provenientes de micélio de *Crinipellis pernicioso* ('20% MCp') obtidas da 2ª filtração do item anterior; extratos aquosos de pó de tecido caulinar de lobeira (*S. lycocarpum*) - ('30% VLA'), e extratos aquosos de pó de tecido foliar de cafeeiro (*Coffea arabica*) densamente infectado por *Hemileia vastatrix* ('30% EFID') foram obtidos conforme detalhamento no Capítulo 2, deste trabalho.

Tecido caulinar de lobeira (*S. lycocarpum*), arbusto hospedeiro silvestre de *C. pernicioso*, densamente infectado e necrosado por este fungo, foi coletado para secagem a 60°C por 24 horas e posterior trituração seguido de moagem. O pó obtido do tecido necrosado foi armazenado sob refrigeração a 4°C. Uma alíquota de 80g do pó obtido foi ressuspensa, incubada em 270 mL de metanol (MeOH) P.A., aproximadamente, e deixada em repouso por 48 horas. Em seguida o sistema sofreu filtração, onde se procedeu a coleta do filtrado metanólico e recondução do resíduo a uma nova re-extração por mais 48 horas.

Os filtrados coletados foram transferidos para balões volumétricos de 250mL e imediatamente submetidos à secagem do solvente por evaporação mediada a evaporador rotatório, em temperatura e rotação constantes de 30°C e 50 rpm. Após a secagem do solvente, o precipitado foi ressuspensão em 300mL de água destilada, homogeneizada numa suspensão finamente dividida e congelada em freezer -20°C para uso experimental, com a amostra sendo denominada '30% VLM'.

Para extração metanólica sobre a biomassa de *C. pernicioso*, uma alíquota de 40g dos micélios obtidos foi ressuspensão, incubada em 200 mL de metanol (MeOH) P.A. e deixada em repouso por 48 horas. Em seguida o sistema sofreu filtração, onde procedeu-se a coleta do filtrado metanólico e recondução do resíduo a uma nova re-extração por mais 48 horas. Os filtrados coletados foram transferidos para balões volumétricos de 250mL e imediatamente submetidos à secagem do solvente por evaporação mediada a evaporador rotatório, em temperatura e rotação constantes de 30°C e 50 rpm. Após a secagem do solvente, o precipitado foi ressuspensão em 200 mL de água destilada, homogeneizada numa suspensão finamente dividida e congelada em freezer -20°C para uso experimental, com a amostra sendo denominada '20% CPM'.

Nos experimentos de acompanhamento de progresso de doença, todos os tratamentos tiveram um correspondente, diluído em solução aquosa, contendo um surfactante comercial Pentra-Bark®, fornecido por Agrichem S.A., na dosagem de 2,4 mL L<sup>-1</sup>, segundo recomendação do fabricante.

#### **4.3 Manutenção e inoculação do isolado. Ensaio de inibição de germinação de conídio de *V. dahliae***

O isolado de *V. dahliae*, proveniente de plantas de quiabeiro (Ijaci, MG), foi cultivado em meio BDA durante 20 dias em câmara de crescimento, a uma

temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 h. Em seguida, discos de meio de cultura foram repicados para novas placas de Petri contendo BDA. O inóculo foi preparado a partir de colônias com 25 dias de incubação, nas mesmas condições descritas, através da adição de 20 mL de água destilada, e posterior raspagem com alça de vidro. A suspensão foi filtrada em gaze dupla, sendo ajustada em hematocitômetro para  $6,5 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>.

A inoculação foi procedida usando-se o método de punção caulinar, descrito por Bugbee e Presley (1967), com uma seringa plástica e agulha estéreis. A agulha foi inserida em um ângulo de 45° com o caule, até atingir o lenho da planta. Uma gota da suspensão de inóculo (aprox. 10 µL) foi injetada no córtex, sendo absorvida em seguida. Testemunhas-controle foram, da mesma forma, injetadas com água destilada esterilizada.

Foram realizados ensaios em lâminas escavadas para identificação de toxidez das frações sobre a germinação de conídios de Vd. Uma suspensão aquosa foi fixada em  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>, e 40 µL foram depositados em cada cavidade de uma lâmina escavada de 3 cavidades, adaptada no interior de uma placa de Petri, em câmara úmida. Uma alíquota de 40 µL de cada tratamento estudado (químico, extratos naturais e testemunha) foi adicionada a cada cavidade, onde previamente recebeu uma marcação em forma de cruz, definindo 5 regiões: 4 quadrantes e o centro. Após 18 horas, 40 conídios de cada região de cada cavidade foram avaliados. Em seguida o percentual de inibição de germinação foi calculado, a partir do número de conídios germinados. O experimento foi desenhado em DIC, com 6 repetições (cavidades).

#### **4.4 Quantificação de doença e coleta de material fresco**

Para medição e quantificação da eficiência na proteção de planta dos extratos testados, foi adotada uma escala de doença baseada em Sidhu e Webster (1977). Mudanças de cacaueteiro, provenientes de seleção susceptível a Vd, com 70



dias após a semeadura, foram pulverizadas com os tratamentos estudados até o ponto de escorrimento, às 18:00 horas. Após 5 dias, todas as plantas, pulverizadas com os tratamentos e pulverizadas com água destilada (testemunha-controle), foram inoculadas com uma suspensão de conídios de Vd e avaliadas ao longo de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 dias após inoculação (DAI). Progresso de doença foi quantificado por meio de análise visual e cálculo de índice de doença, seguindo a escala (0-4) de área lesionada adotada, considerando redução de área foliar sadia devido à clorose, necrose, epinastia e murcha: 0, sem lesão; 1, lesões presentes em 0-25 % de área foliar; 2, lesões presentes em 26-50 % de área foliar; 3, lesões presentes em 51-75 % de área foliar; 4, >76 % de área coberta por sintoma, ou entrenó sem pecíolo/folha. Índice da doença representa a média das notas de todas as folhas avaliadas de uma planta. O cálculo da AACPD se deu por meio da seguinte fórmula:  $AACPD = \sum ((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$ , onde Y representa o índice médio da doença, t o intervalo de dias entre avaliações e i o número de avaliações no tempo (Campbell e Madden, 1990). Proteção de planta foi estimada pela relação:  $(1 - x/y)$ , onde x representa AACPD das plantas tratadas e y, AACPD dos controles (Li et al., 1996).

Foram realizados então, do modo acima descrito, dois experimentos, denominados 'A' e 'B', em simultâneo, com o mesmo esquema experimental e com Pentra-Bark® e os controles pulverizados com água e pulverizados com água e inoculado, além do ASM, como fatores comuns.

Em outro experimento, plântulas de cacaueteiro, 25 dias após semeadura, foram pulverizadas com '20% MCp'; '30% VLA'; Ecolife® (1,5 mL L<sup>-1</sup>), ASM (0,2 mg mL<sup>-1</sup>), enxofre (3 g L<sup>-1</sup>), '30% CPA' e '30% EFID' até o ponto de escorrimento. Plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água (controle) foram coletadas em 4, 8, 13 e 18 dias após as pulverizações (DAP). Plantas tratadas e inoculadas, e testemunhas pulverizadas com água e inoculadas foram

coletados somente em 8, 13 e 18 DAP. A inoculação com a suspensão de Vd foi conduzida 5 DAP em plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água destilada. Antes de cada coleta, às 9:00 h, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento ajustada para 27°C, 75 % de umidade relativa e 230  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidade de fluxo de fótons, por 1 hora. Em seguida, as folhas foram coletadas, homogeneizadas e amostradas, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente utilizadas para determinações bioquímicas.

Tendo mostrado boa performance em experimentos de tomateiro (Capítulo 2), quitosana extraída de micélio de *Crinipellis pernicioso* ('20% MCP') foi incluído entre os extratos a serem pulverizados em cacauzeiro para coleta e análise de folhas.

#### 4.5 Determinações bioquímicas

Material foliar foi homogeneizado por meio de almofariz e pistilo em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo EDTA 0,1 mM durante 5 minutos, sobre um banho de gelo. Após filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 13000 g por 15 min e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. Todos os passos foram executados em 0-4°C. Proteína solúvel contida nos extratos foi aferida pelo ensaio de Bradford (1976), usando um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de peroxidases de guaiacol, oxidases de polifenóis, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, quantificação de lignina, determinação colorimétrica de fenóis totais e teores de clorofilas foram obtidos como detalhado nos itens 4.5 e 4.6 do Capítulo 2, respeitando apenas os ajustes de diluição e alíquotagem para o caso do tecido foliar de cacauzeiro. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

Da mesma forma, metodologias de eletroforese em gel de poliacrilamida e revelação subsequente de peroxidases e quitinases no gel, estão descritos também no item 4.5 do Capítulo 2, neste trabalho.

#### **4.6 Delineamento experimental e métodos estatísticos**

Delineamento em blocos casualizados foi utilizado nos experimentos de quantificação de doença e experimentos de época de coleta de material vegetal, envolvendo plantas tratadas (pulverizadas), plantas tratadas e inoculadas; testemunhas (controles) pulverizadas com água e pulverizadas com água e inoculadas. Teste de inibição de germinação de conídios de Vd recebeu desenho inteiramente ao acaso. Estatística descritiva, análise de variância, testes F e Tukey ao nível de significância de 5 % foram conduzidos utilizando-se o procedimento *general linear model* (GLM) do SAS (*Statistical Analysis System* Inc., Cary, NC, USA). Quando efeitos de tratamentos foram diferentes ( $P < 0,05$ ), médias foram separadas pelo teste t de Student (mínima diferença significativa), com o auxílio do SISVAR (© Daniel Furtado Ferreira, 2003), aos níveis de significância de 0,1, 1 e 5 %. Teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) foi feito com o auxílio da mesma ferramenta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados mostraram o progresso de doença das plantas tratadas em comparação com as testemunhas pulverizadas com água e inoculadas, juntamente ao valor de AACPD, em 6 avaliações (Figs. 1 e 2). Foi comprovada uma relativa proteção da população susceptível de cacauero contra a murcha vascular causada por Vd, em plantas pré-tratadas com os tratamentos estudados. A utilização dos extratos naturais como pré-tratamentos foi baseada na premissa de que estes representam misturas de várias substâncias solúveis (Nürnberger e Brunner, 2002) capazes de eliciar respostas de defesa de planta.

No experimento 'A' (Fig. 1), os tratamentos mais eficientes como protetores foram enxofre solúvel, '30% EFID', Ecolife® e o já comprovado ASM, com 31,5%, 30,8%, 30,2% e 29,7% de proteção, nesta ordem (Fig. 3). No experimento 'B' (Fig. 2), os tratamentos que mostraram as maiores respostas foram ASM, '30% VLA', '20% CPM' e '30% CPA + Pentra- Bark®', com 29,9%, 24,3%, 23,7% e 21,6% de proteção, respectivamente (Fig. 4).

Embora mostrando relativa redução no nível de índice da doença, plantas pulverizadas com os demais tratamentos não incorreram em resultados consistentes de proteção, permanecendo em patamares menores de índice de doença. Peróxido de hidrogênio e todos os outros, associados ao surfactante Pentra-Bark®, mostraram significativa perda de capacidade de proteção, nos 2 experimentos avaliados. Apesar dos valores muito próximos de proteção de planta atribuída ao ASM e de AACPD dos controles pulverizados com água, comparando-se os experimentos/eventos independentes 'A' e 'B', os valores encontrados de proteção em plantas tratadas apenas pelo surfactante foram discrepantes (Figs 1B e 2B).

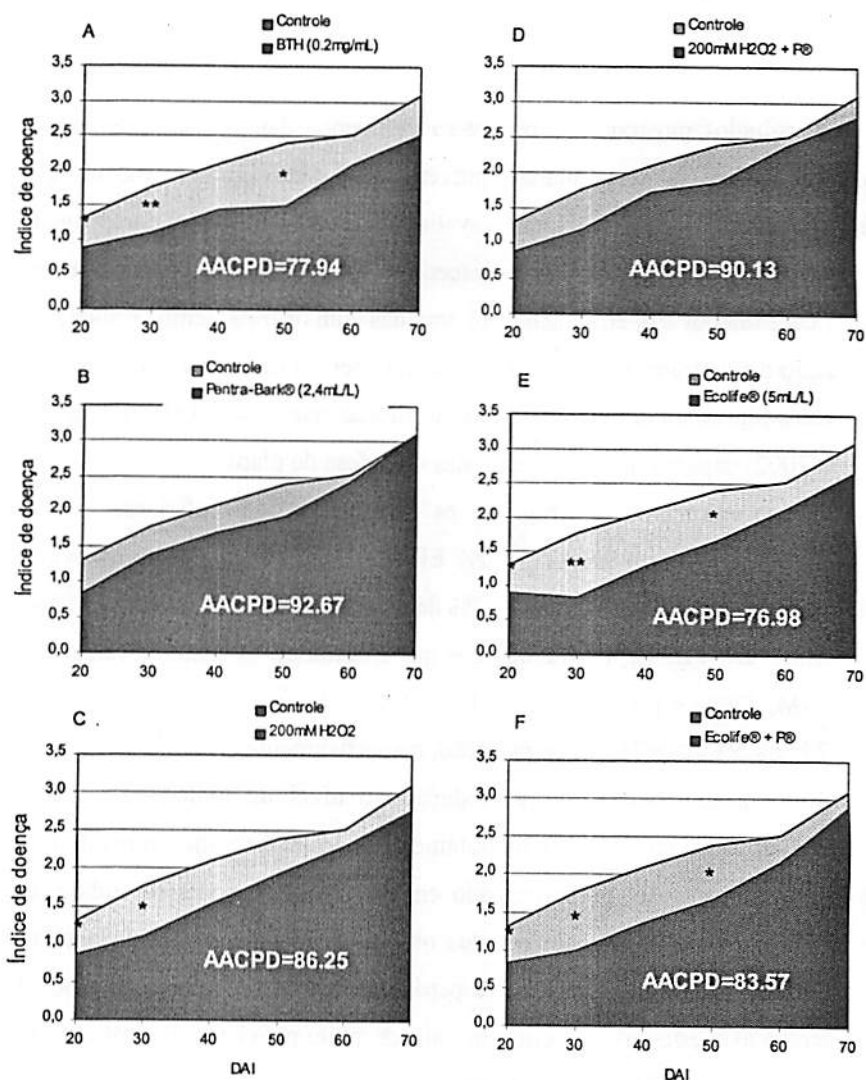
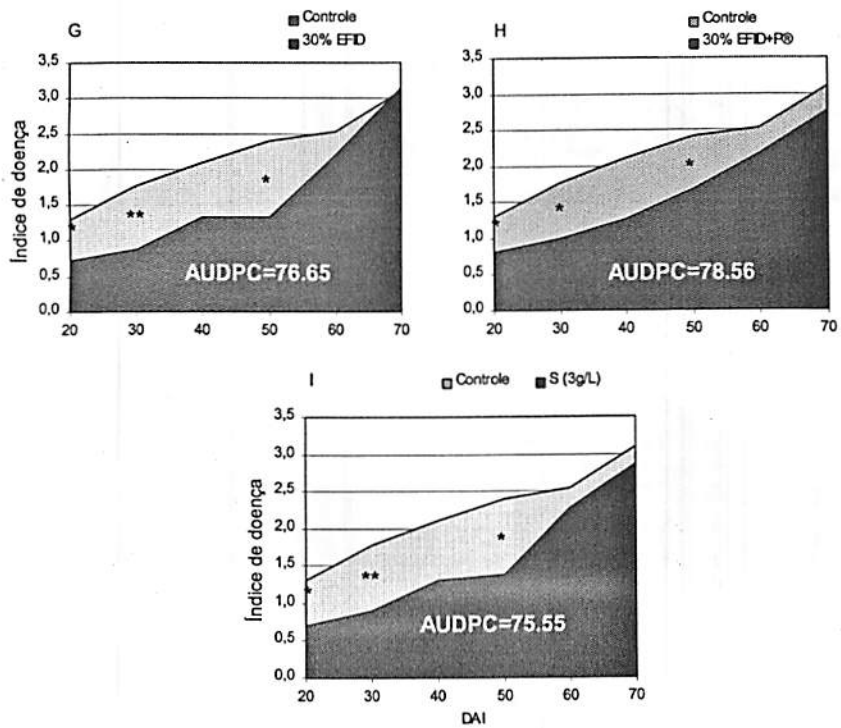


FIGURA 1. Eficácia de A. ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), B. Pentra-Bark®, C.  $\text{H}_2\text{O}_2$  200mM, D.  $\text{H}_2\text{O}_2$  200mM + Pentra-Bark®, E. Ecolife® ( $5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e F. Ecolife® + Pentra-Bark® na redução de AACPD da murcha vascular em cacauieiro susceptível a Vd, aos 20, 30, 40, 50, 60 e 70 DAI. Asteriscos referem-se a diferenças significativas a (\*)  $P=0,05$ , (\*\*)  $P=0,01$  entre controle e tratamentos, de acordo com teste t de Student (LSD). (...continua...)

FIGURA 1. Continuação.



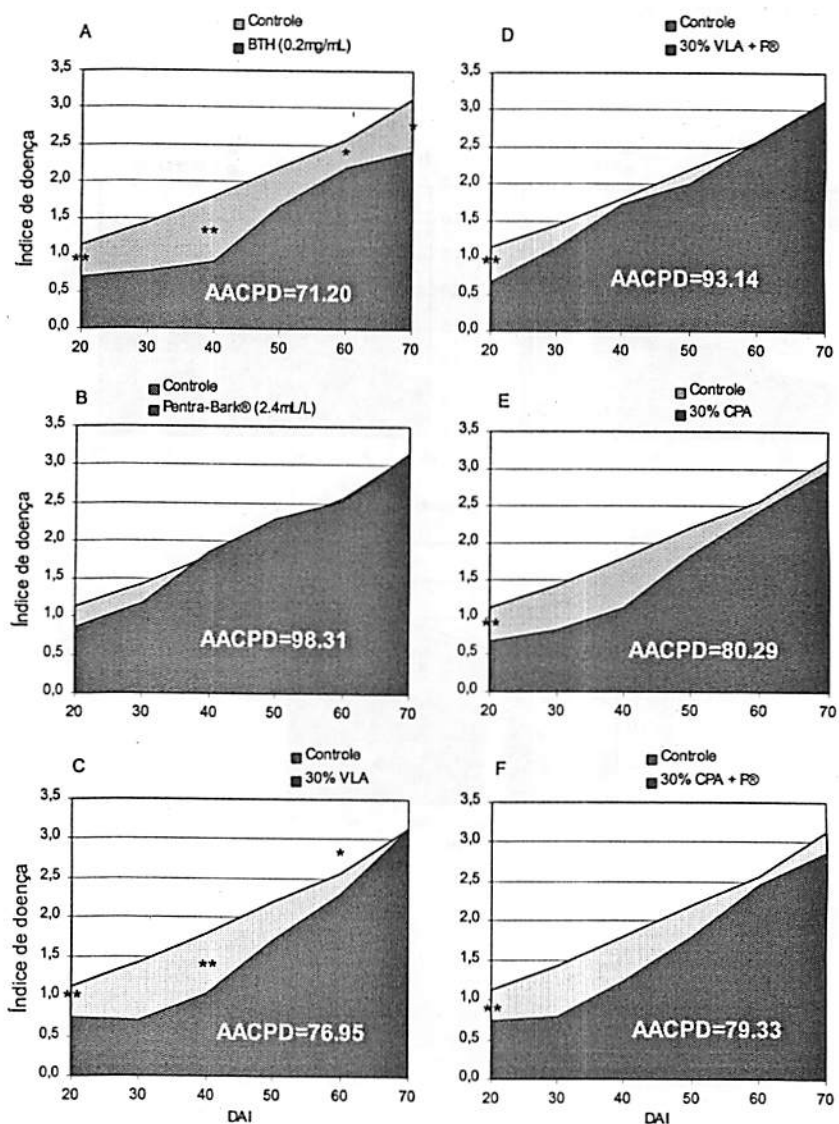
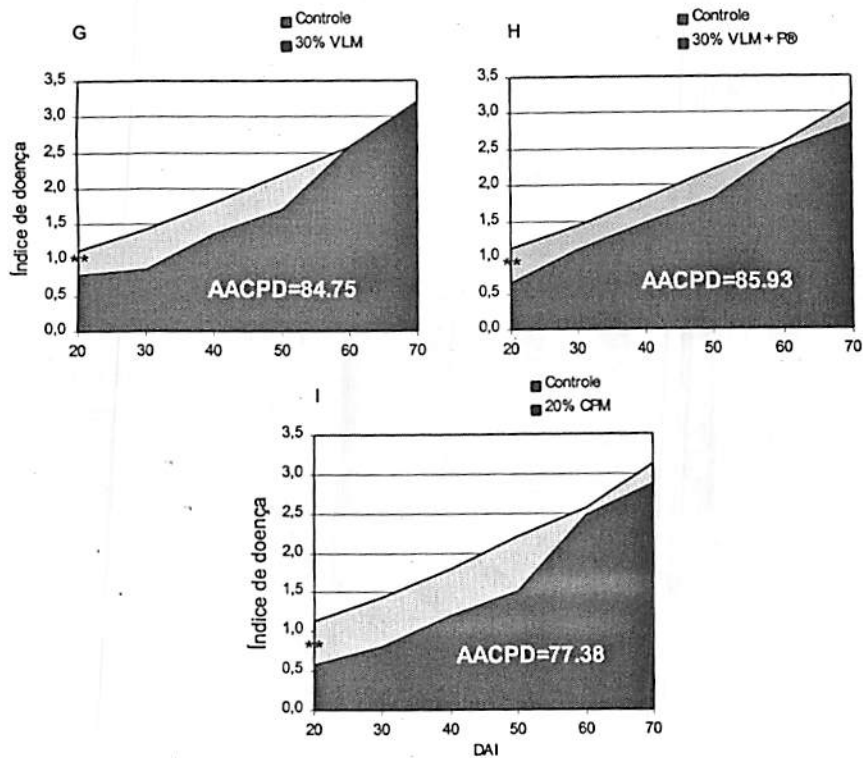


FIGURA 2. Eficácia de A. ASM ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), B. Pentra-Bark®, C. '30% VLA', D. '30% VLA' + P-B®, E. '30% CPA' e F. '30% CPA' + P-B® na redução de AACPD da murcha vascular em cacauieiro susceptível, aos 20, 30, 40, 50, 60 e 70 DAI. Asteriscos referem-se a diferenças significativas a (\*)  $P=0,05$ , (\*\*)  $P=0,01$  entre controle e tratamentos, de acordo com teste t de Student (LSD). (Continua..)

FIGURA 2. Continuação





Muito embora tenha sido detectada uma heterogeneidade na resposta de plantas tratadas apenas pelo surfactante, foi verificado, durante as avaliações, que o mesmo possui função inerte como protetor. Mais ainda, o produto parece reduzir, ao contrário do esperado, a performance dos tratamentos estudados, seja ele químico ou formulação natural.

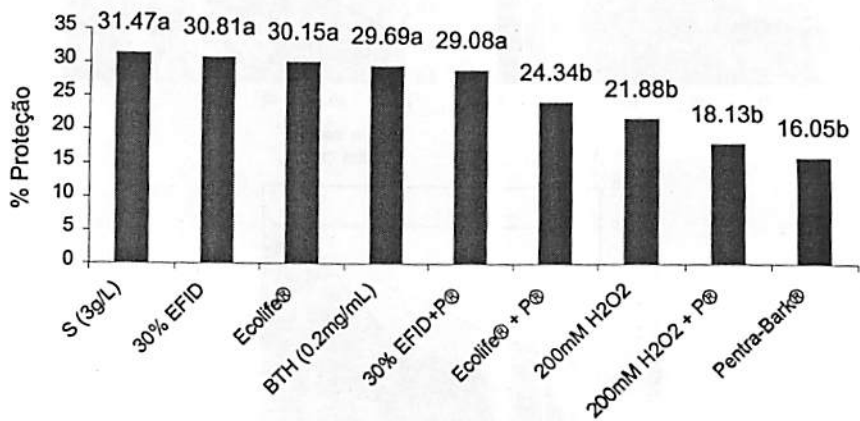


FIGURA 3. Percentagem de proteção de cacauero contra murcha vascular causada por Vd, após 70 DAI e 6 avaliações do experimento 'A'. % de proteção foi obtida a partir dos valores de AACPD de cada tratamento, de acordo com Li et al. (1996). Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ( $P=0,05$ ).

Enxofre solúvel, Ecolife® e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoveram inibição *in vitro* da germinação de esporangios de Vd em lâmina escavada, em experimento o qual foi utilizada água destilada como controle (Tabela 1). '30% EFID', '30% VLM' e '20% MCp' promoveram uma inibição significativamente menor em

comparação, aos três anteriores. '30% VLA' e ASM mostraram os menores valores de inibição de germinação de conídios de Vd. É importante frisar que a atividade antifúngica dos tratamentos foi avaliada por contato direto entre a substância testada e o conídio de Vd, e, no caso experimental, não cabe projetar um fenômeno de contato entre extrato pulverizado sobre as folhas e o esporo, já que o sítio de colonização e de desenvolvimento de doença encontra-se no xilema.

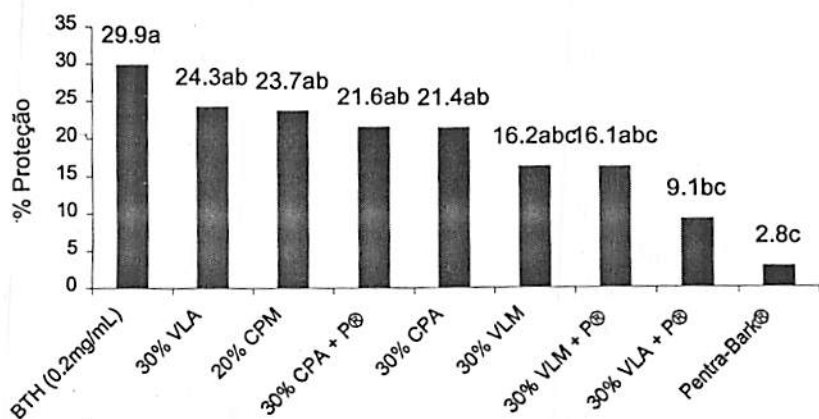


FIGURA 4. Percentagem de proteção de cacaueteiro contra murcha vascular causada por Vd, após 70 DAI e 6 avaliações do experimento 'B'. % de proteção foi obtida a partir dos valores de AACPD de cada tratamento, de acordo com Li et al. (1996). Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P=0,05$ ).

Não foi possível, a partir dos dados apresentados e da natureza dos experimentos (experimentos de indução de resistência), correlacionar potencial antifúngico e redução de lesão *in planta*, neste estudo, tampouco fazer observação de disseminação de princípio ativo sistemicamente. Portanto, ensaios de potencial antifúngico, nesse contexto, foram adotados visando simplesmente à caracterização da capacidade antifúngica dos tratamentos investigados.

TABELA 1. Percentagem de germinação de conídios de *Verticillium dahliae* em lâminas escavadas com os tratamentos estudados e respectivas dosagens

<sup>1</sup> Tratamento	<sup>2</sup> no. de conídios	<sup>3</sup> % de inibição
Água destilada (controle)	157,5 ± 5,8	0,0 f
30 % VLA	73,5 ± 8,3	53,4 de
30 % EFID	23,5 ± 13,9	85,1 b
30 % VLM	22,0 ± 5,4	86,1 b
S (3 g L <sup>-1</sup> )	1,5 ± 1,3	99,0 a
30 % FLO	60,2 ± 9,0	61,7 cd
ASM (0,2 mg mL <sup>-1</sup> )	89,7 ± 21,2	42,9 e
Pentra-Bark® (2,4 mL L <sup>-1</sup> )	70,2 ± 9,9	55,3 d
Ecolife® (5 mL L <sup>-1</sup> )	0,0 ± 0,0	100,0 a
20 % MCp	44,7 ± 8,2	71,6 bc
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200mM	0,0 ± 0,0	100,0 a

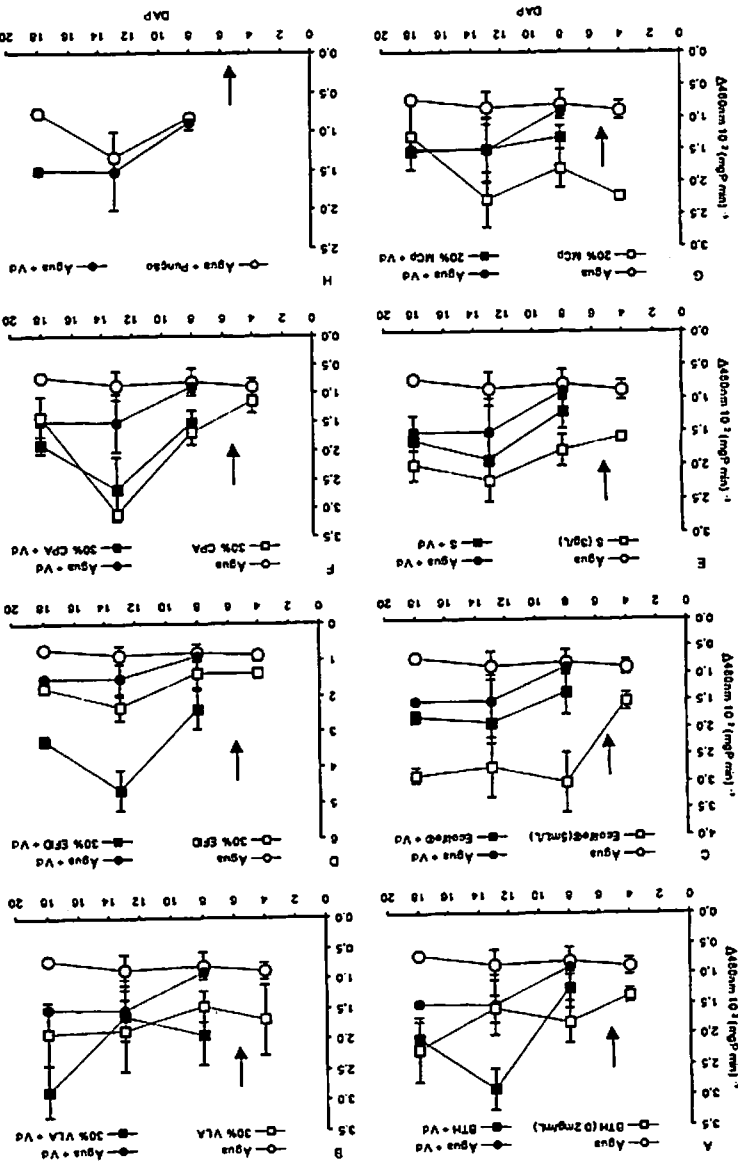
<sup>1</sup> Valores com as mesmas letras não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey (P=0,05). Média de 6 repetições.

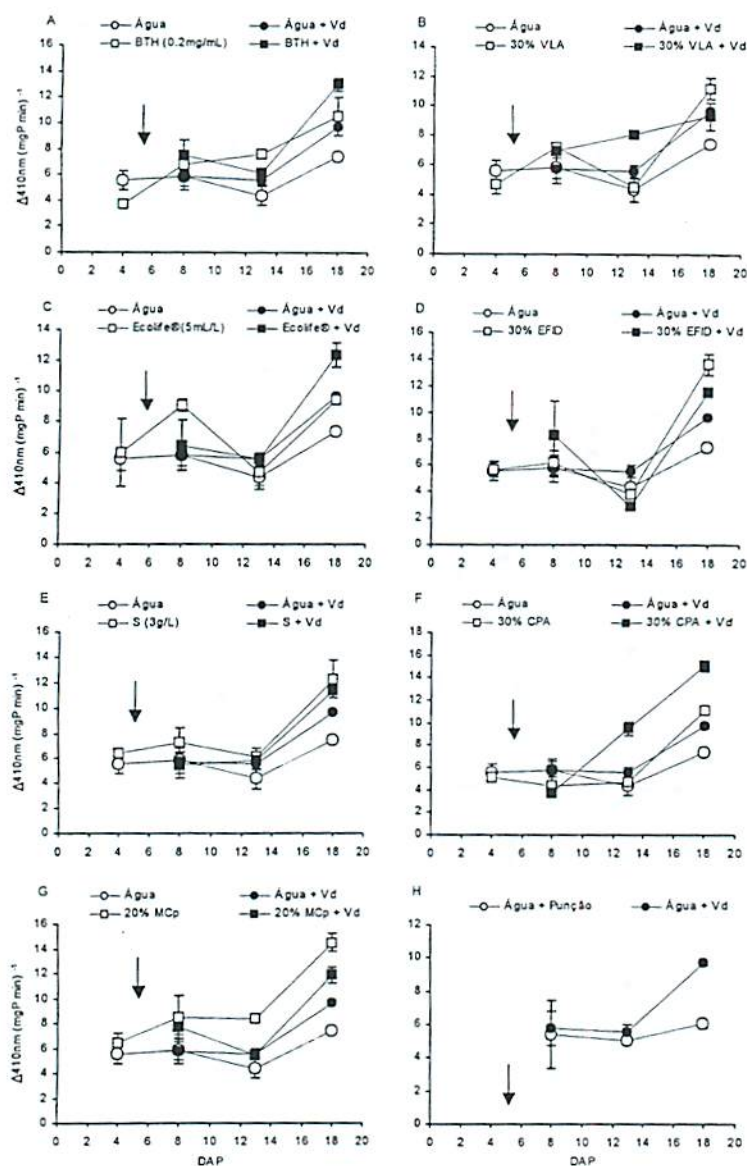
<sup>2</sup> Soma de conídios germinados em 5 setores da lâmina escavada, contabilizados 40 conídios por setor.

<sup>3</sup> Percentagem do controle.

Aumento das atividades de proteínas relacionadas à patogênese em folhas de cacauzeiro susceptível foi associada com a expressão de resistência induzida local (foliar) por '20 % MCp', '30 % VLA', Ecolife®, ASM, '30% EFID', 30% CPA' e enxofre.

FIGURA 5. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX) em folhas de cacaueteiro, após tratamentos com A. ASM, B. 30% VLA, C. Ecolife®, D. 30% EFID, E. enxofre, F. 30% CPA, G. 20% MCP e H. Pungão x inoculação. Setas indicam inoculação com Vd em 5 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.





**FIGURA 6.** Atividade de oxidases de polifenóis (PPO) em folhas de cacauero, após tratamentos com A. ASM, B. '30% VLA', C. Ecolife®, D. '30% EFID', E. enxofre, F. '30% CPA', G. '20% MCP' e H. Punção x inoculação. Setas indicam inoculação com Vd em 5 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.

Com relação à atividade de peroxidases de guaiacol ao longo do período adotado para o experimento de coleta de material fresco, plantas pulverizadas com todos os tratamentos mostraram respostas de aumento em relação às testemunhas, considerando plantas apenas pulverizadas, e pulverizadas e inoculadas (Fig. 5). Poucas foram as ocorrências de incremento significativo, como por exemplo, em plantas pulverizadas com Ecolife® (Fig. 5C) e '30% EFID' + Vd foram encontrados valores de atividade POX 3,2 e 4,6 vezes maior que o controle em 8 e 13 DAP, respectivamente. No entanto, respostas POX em plantas tratadas, e tratadas e inoculadas, mostraram-se consistentes e, em geral, positivamente correlacionadas com um aumento médio no acúmulo de derivados de lignina (Tabela 2), principalmente em plantas pulverizadas com ASM, '20% MCp' e '30% VLA', de maneira semelhante a respostas encontradas nos experimentos com tomateiro (Capítulo 2).

Considerando a atividade PPO, novamente comportamentos similares foram evidenciados nas plantas tratadas e respectivos controles, contudo sem apresentar diferenças significativas, ao longo dos DAP. De uma maneira geral, todas as plantas apresentaram uma tendência crescente de aumento na atividade de PPO, sem contrastes entre plantas não pulverizadas e pulverizadas (Fig. 6).

Em resposta aos pré-tratamentos com químicos, extratos e formulações naturais, respostas de atividade de CHI e GLU em folhas de cacauero susceptível mostraram incrementos em plantas tratadas, tratadas e inoculadas, com relação a controles pulverizados com água, e pulverizados com água e inoculados. Plantas tratadas, e tratadas e inoculadas confirmaram uma tendência de aumento de atividades de ambas enzimas, sem diferir, no entanto, significativamente, na grande maioria dos pontos estudados (Figs. 7 e 8). Esses resultados reforçam a hipótese de que os tratamentos investigados causaram algum tipo de ativação e/ou síntese *de novo* sobre as proteínas relacionadas à patogênese avaliadas.

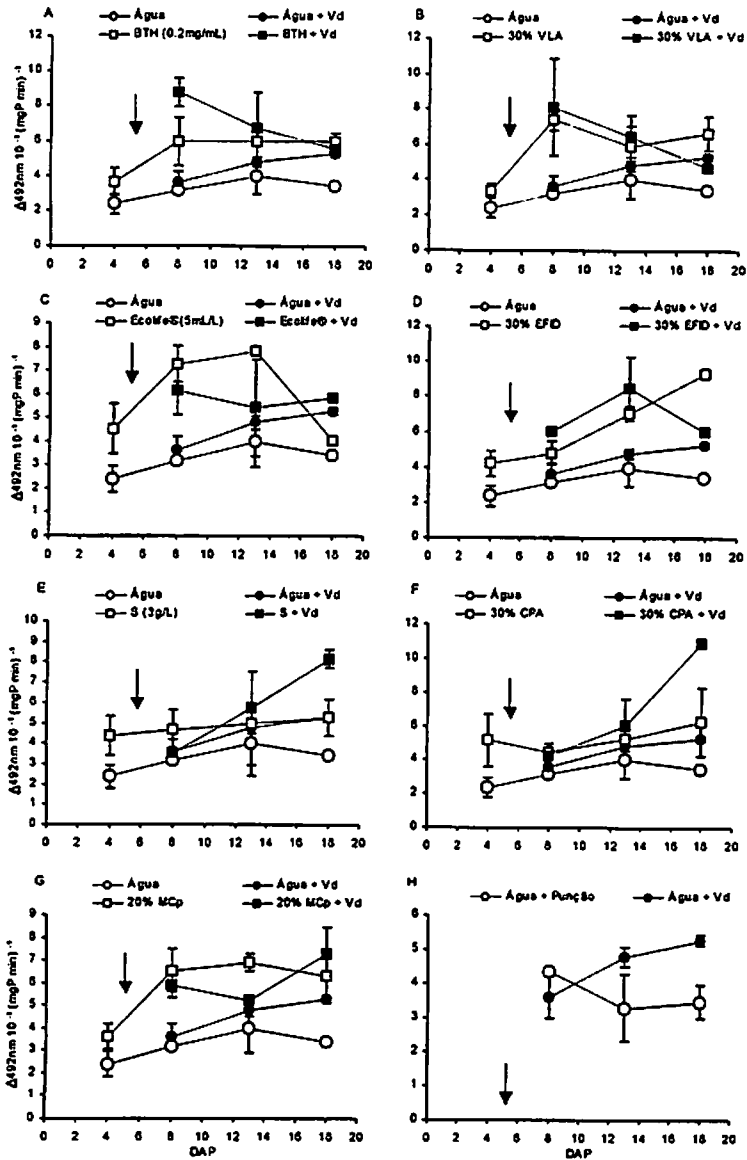
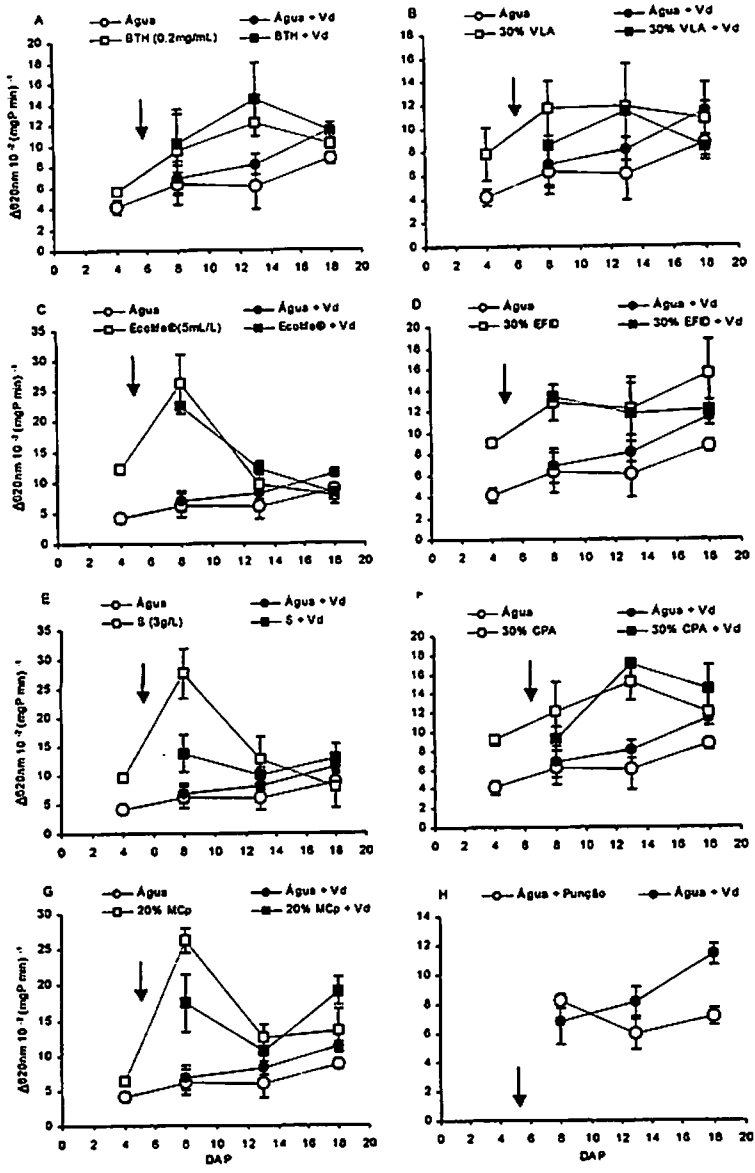


FIGURA 7. Atividade de quitinasas (CHI) em folhas de cacaeiro, após tratamentos com A. ASM, B. '30% VLA', C. Ecolife®, D. '30% EFID', E. enxofre, F. '30% CPA', G. '20% MCP' e H. Punção x inoculação. Setas indicam inoculação com Vd em 5 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.



**FIGURA 8.** Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) em folhas de cacauero, após tratamentos com A. ASM, B. '30% VLA', C. EcoLife®, D. '30% EFID', E. enxofre, F. '30% CPA', G. '20% MCP' e H. Punção x inoculação. Setas indicam inoculação com Vd em 5 DAP. Barras de erros indicam o desvio padrão.



Foi considerado que plantas tratadas por enxofre e '30% CPA' (Figs. 7E e 7F) não responderam consistentemente com aumento de atividade de quitinases, a despeito das leituras desta enzima a 18 DAP, em plantas pulverizadas com ambos tratamentos e inoculadas, terem atingido um patamar de atividade cerca de 2,0 vezes o controle pulverizado com água e inoculado. Por outro lado, plantas tratadas com os demais químicos e extratos naturais, inoculadas e não inoculadas com Vd, revelaram uma tendência de incremento definida ao longo dos DAP, com relação aos respectivos controles inoculados e não inoculados (Fig. 7).

Considerando as respostas de  $\beta$ -1,3-glucanases, plantas pulverizadas com Ecolife®, enxofre e '20% MCp' (Figs. 8C, 8E e 8G) revelaram uma tendência caracterizada por um pico de atividade a 8 DAP das plantas tratadas e não inoculadas, acompanhada pelas plantas tratadas e inoculadas, seguida de proeminente decréscimo de atividade GLU. Os valores de atividade da enzima em questão a 8 DAP, aparentemente causada pela exposição aos tratamentos mencionados, atingiram um patamar cerca de 6,0 vezes o nível de atividade correspondente ao dos controles pulverizados com água, inoculados e não inoculados. De outro modo, plantas tratadas por ASM, '30% VLA', '30% EFID' e '30% CPA', inoculadas e não inoculadas, responderam com incremento de atividade GLU em todos os DAP avaliados, em relação aos controles pulverizados com água, inoculados e não inoculados.

Muito embora tenha sido verificada uma tendência consistente sobre os dados de CHI, GLU e também POX, na grande maioria dos pontos estudados não foram evidenciadas diferenças significativas, lembrando que diferença significativa diz respeito a desvios de médias que não estejam sobrepostos. Tal dispersão dos dados pode ter sofrido influência da heterogeneidade genética do material susceptível estudado, por tratar-se de geração segregante de parentais susceptíveis para murcha vascular causada por Vd. Reforça a afirmativa a

evidência de que algumas isoformas distintas de quitinase, aparentemente sem correspondência fisiológica, tenham sido reveladas em gel a partir do material vegetal testado (Fig. 9). Por outro lado, considerando a população segregante de sementes de cacauero utilizadas no experimento, foi possível verificar uma média representativa de indução de resistência nesta população, sugerindo que o fenômeno de reação de defesa permaneceu conservado em meio à heterogeneidade genética.

O aumento nas respostas de atividades de enzimas relacionadas à patogênese foi observado após a exposição das plantas aos químicos, extratos e formulações testados, previamente avaliados como relativamente eficientes na redução de progresso de doença. Além disso, houve deposição de lignina em folhas coletadas aos 13 e 18 DAP (Tabela 2), mostrando relação com o aumento de POX e respostas menos consistentes de PPO. Como mais detalhadamente discutido no Capítulo 2, atividades de POX, PPO e PAL, resultando em reforço da parede celular, têm sido associados com indução de resistência local e sistêmica (Anterola e Lewis, 2002). Plantas reagem à invasão de patógenos com a ativação de uma rede de respostas inatas que pode ser expressa localmente, no sítio de infecção de invasão do patógeno, bem como sistemicamente, em tecido ainda não infectado (Maleck e Lawton, 1998). Quitinases e glucanases de planta participam de sistemas de defesa com fatores de hidrólise sobre componentes de parede celulares fúngicas e bacterianas. Quitinases de planta liberam oligômeros de quitina a partir de segmentos de parede celular fúngica (Stintzi et al., 1993). Resultados de CHI e GLU induzidas em folhas pelos tratamentos estudados reforçam que eles poderiam ser aplicados buscando controlar doenças foliares causadas por fungos, aproveitando esse aumento evidenciado de poder hidrolítico do tecido.

Entretanto, com os dados presentes, pouco se pode afirmar a respeito da influência do aumento diferenciado nos níveis foliares de CHI e GLU sobre a

contenção da lesão causada pelo Vd em tecido vascular, já que o sítio do patógeno não se localiza na folha. Experimentos de reação sistêmica da planta e coleta de tecido epicotiledonar, próximo à punção devem ser realizados para o esclarecimento do papel dessas enzimas no contexto da verticiliose. Como perspectiva, um experimento recente, conduzido nos mesmos moldes, forneceu material proveniente da região epicotiledonar para ensaio de determinação de atividade de peroxidases e oxidases de polifenóis. Dados preliminares, em experimento com cacauero susceptível EEG 64, confirmam que alguns dos tratamentos avaliados induziram aumentos nas atividades de POX e PPO em segmentos epicotiledonares, confirmando uma possível ação sistêmica a partir de pulverização sobre folhas.

Acumulação de derivados TGA (lignina ácido-solúvel e polímeros *lignin-like*) em plantas de cacauero pulverizadas com água (testemunha sadia), pulverizadas com água e inoculadas (controle), tratadas, e tratadas e inoculadas foi determinada aos 13 e 18 DAP (Tabela 2). Em 13 DAP, plantas tratadas com ASM, '30% EFID', '20% MCp' e '30 % VLA' mostraram valores de lignificação atingindo entre 120% a 140% dos controles pulverizados com água, muito embora sem apresentar diferença significativa. Respostas ainda mais pronunciadas entre controles e tratamentos foram vistas a 18 DAP nas folhas analisadas. Plantas tratadas com ASM mais inoculação, '20% MCp' mais inoculação, '30% VLA' mais inoculação e ASM atingiram níveis significativos entre 135% e 150% dos controles pulverizados com água, inoculados, não inoculados e testemunha injuriada por punção. É relatado que a lignina possua funções importantes na sustentação da planta, transporte de água e defesa de planta (Patzlaff et al., 2003). O crescimento e atividade de Vd no tecido vascular susceptível envolvem a oclusão do xilema por tiloses e resíduos que impedem o transporte de água, podendo disparar respostas fisiológicas na planta semelhantes às causadas por restrição hídrica (Sadras et al., 2000).

TABELA 2. Efeitos de químicos, extratos e formulações naturais sobre a deposição de lignina (derivados TGA) e conteúdo de fenóis totais em folhas de plantas de cacauero susceptível a Vd coletadas a 8, 13 e 18 DAP. Efeitos de químicos, extratos e formulações naturais sobre o teor de pigmentos fotossintéticos em folhas, a 18 DAP

<sup>1</sup> Tratamentos	Lignina ( $\mu\text{g } 10^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ )		Fenóis tt ( $\mu\text{g } 10^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ )		Pigmentos fotossintéticos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
					Clorof. A	Clorof. B	Carotenóides
	<sup>2</sup> Dias após pulverizações (DAP)						
	13	18	8	13	18	18	18
Água	3,27 ± 0,49a	5,0 ± 0,39de	2,21 ± 0,08a	3,98 ± 0,07a	12,0 ± 0,01ab	7,7 ± 1,6c	1,81 ± 0,09a
Água + Vd	3,53 ± 0,12a	4,8 ± 0,36de	2,39 ± 0,17a	2,26 ± 0,10b	11,8 ± 0,11ab	12,3 ± 0,5abc	1,33 ± 0,16a
Água + Punção	3,53 ± 0,53a	5,1 ± 0,16cde	2,06 ± 0,02a	2,45 ± 0,03b	11,9 ± 0,12ab	10,4 ± 2,05abc	1,61 ± 0,50a
ASM (0,2mg/mL)	4,51 ± 0,62a	6,9 ± 0,18ab	2,04 ± 0,10a	2,28 ± 0,01b	11,7 ± 0,28ab	8,6 ± 1,1bc	1,98 ± 0,33a
ASM + Vd	3,82 ± 0,36a	7,4 ± 0,35a	1,91 ± 0,04a	2,13 ± 0,03b	11,9 ± 0,12ab	10,6 ± 1,23abc	2,20 ± 0,55a
20% MCp	3,98 ± 0,08a	6,3 ± 0,42abcd	2,44 ± 0,04a	1,99 ± 0,01b	11,7 ± 0,30ab	16,4 ± 0,97a	1,16 ± 0,37a
20% MCp + Vd	3,30 ± 0,09a	7,2 ± 0,41ab	1,66 ± 0,66a	1,89 ± 0,11b	11,8 ± 0,20ab	10,8 ± 1,69abc	2,43 ± 0,37a
30% VLA	3,91 ± 0,62a	6,7 ± 0,45abc	1,64 ± 0,12a	2,36 ± 0,01b	11,4 ± 0,07b	14,5 ± 0,13ab	1,19 ± 0,33a
30% VLA + Vd	3,80 ± 0,05a	7,2 ± 0,10ab	1,93 ± 0,19a	2,03 ± 0,48b	11,7 ± 0,06ab	12,1 ± 0,42abc	1,66 ± 0,13a
Ecolife®	3,85 ± 0,11a	5,8 ± 0,01abcde	1,92 ± 0,32a	1,32 ± 0,55b	12,0 ± 0,02ab	11,4 ± 1,39abc	1,90 ± 0,04a
Ecolife® + Vd	3,77 ± 0,29a	6,4 ± 0,05abcd	1,79 ± 0,12a	1,98 ± 0,12b	11,7 ± 0,05ab	12,5 ± 0,59abc	2,19 ± 0,26a
30% EFID	3,54 ± 0,69a	6,7 ± 0,3abc	2,15 ± 0,04a	1,97 ± 0,11b	12,0 ± 0,02ab	10,9 ± 0,08abc	1,98 ± 0,10a
30% EFID + Vd	3,98 ± 0,27a	6,2 ± 0,05abcd	2,20 ± 0,17a	2,07 ± 0,04b	12,1 ± 0,03ab	9,6 ± 0,20bc	2,15 ± 0,01a
30% CPA	3,76 ± 0,11a	4,6 ± 0,32e	1,81 ± 0,02a	1,82 ± 0,10b	11,9 ± 0,21ab	10,8 ± 1,77abc	2,33 ± 0,08a
30% CPA + Vd	3,35 ± 0,32a	4,2 ± 0,40c	1,95 ± 0,20a	1,81 ± 0,15b	11,9 ± 0,05ab	12,8 ± 0,67abc	2,01 ± 0,39a
Enxofre	3,44 ± 0,02a	6,9 ± 0,19ab	1,81 ± 0,08a	2,33 ± 0,25b	11,9 ± 0,03ab	11,9 ± 0,22abc	1,83 ± 0,04a
Enxofre + Vd	3,11 ± 0,09a	5,7 ± 0,13bcde	1,67 ± 0,27a	1,78 ± 0,30b	12,1 ± 0,01a	9,7 ± 0,20bc	2,12 ± 0,04a

<sup>1</sup> ASM, formulação e extratos naturais foram pulverizados nas folhas 25 dias após semeadura e plantas foram inoculadas com isolado virulento de Vd 5 DAP.

<sup>2</sup> Médias ± desvios. Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (P=0,05).

Nesse sentido, há poucos relatos de respostas de lignificação na tolerância da planta à restrição hídrica (Leinhos e Bergmann, 1995; Deetz et al., 1996), mas, principalmente, respostas (não necessariamente ligadas à defesa) da planta ao progresso de sintomas causado por Vd, em sua influência negativa sobre o transporte de água. Pomar et al., (2004), por exemplo, concluíram que modificações no conteúdo e na composição de monolignóis de lignina retardam, sem impedir, o desenvolvimento de sintomas de verticiliose em pimenta. Uma vez mais cabe lembrar que os dados de lignificação em folhas de cacaueteiro, aqui relatados, aparentemente não serviriam para justificar redução de progresso de doença. Da mesma forma, como interpretado dos resultados de atividade em folhas de GLU e CHI, experimentos de reação sistêmica da planta e coleta de tecido epicotiledonar, próximo à punção, devem ser realizados para o esclarecimento do papel da lignificação na integridade dos vasos do xilema afetados por Vd. Contudo, existem, dentro do sistema cacaueteiro x Vd em estudo, poucos dados preliminares que possam direcionar projeções, permanecendo a hipótese da lignificação caulinar ativada sistemicamente pelos tratamentos estudados carente de experimentação.

Com relação ao conteúdo de fenóis totais, foi evidenciada uma leve redução nos valores das plantas tratadas (Tabela 2). A 8 DAP, conteúdo de fenóis totais em folhas de plantas pulverizadas com químicos, formulações e extratos naturais estudados situou-se entre os maiores valores dos controles pulverizados com água, e pulverizados com água e inoculados, e os menores valores de plantas '20% MCp' mais inoculação e '30% VLA', à exceção do material tratado com '20% MCp', o qual inesperadamente atingiu o maior valor. O mesmo perfil de queda sensível nos teores de fenóis totais em plantas tratadas foi evidenciado também a 13 DAP, contudo sem diferenças significativas entre os tratamentos.

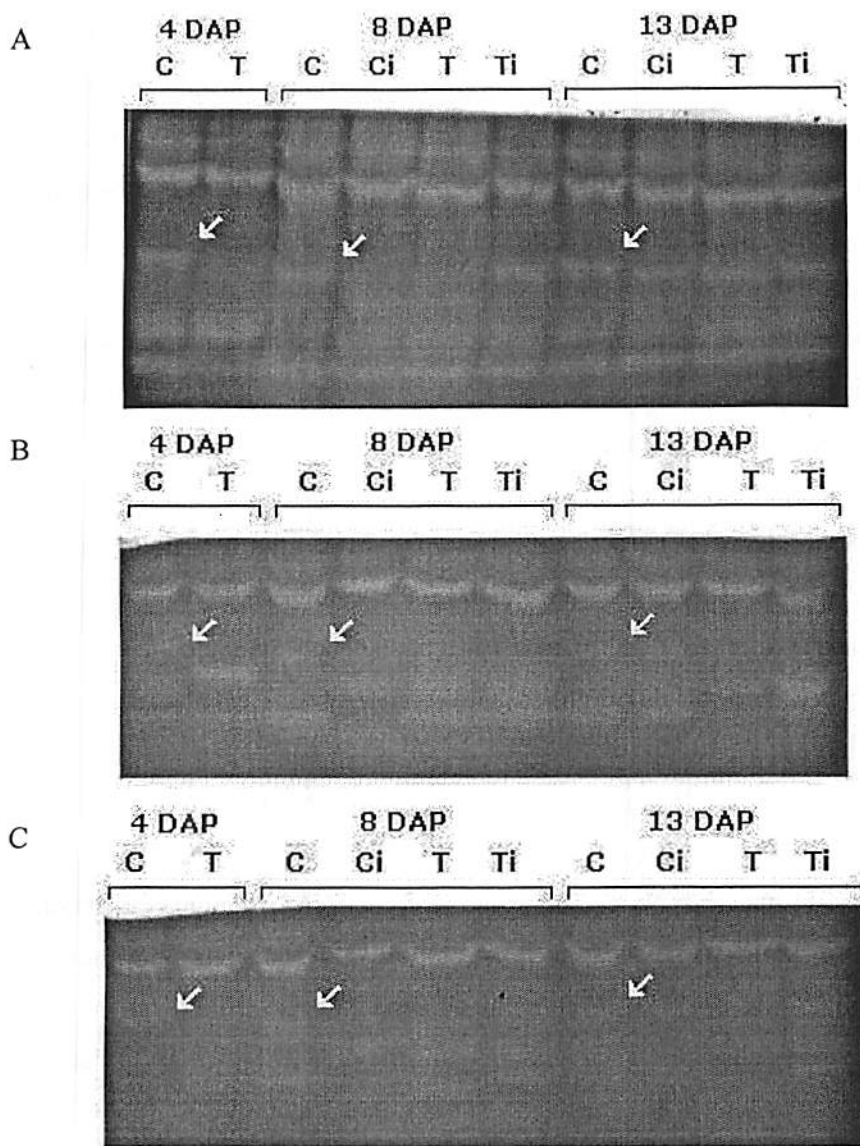


FIGURA 9. Eletroforese em condições nativas revelando isoformas de quitinasases (CHI) em plantas pulverizadas com A. ASM, B. '30% VLA' e C. Ecolife®. Quantidade de proteína por poço: 8 µg. Tempos: 4 DAP (sadia e tratada); 8 e 13 DAP (sadia, controle inoculado, tratada, e tratada e inoculada). Setas indicam prováveis isoformas em *downregulation*. Impressão negativa.

Com relação aos teores de clorofilas a e b, e carotenóides a 18 DAP (13 DAI) não foi evidenciado diferenças marcantes entre plantas tratadas e respectivos controles (Tabela 2). Sintomas inquestionáveis de verticilliose aparecem comumente após 30 DAI, não sendo possível evidenciar sintomas claros da doença até o último dia de coleta de material vegetal (18 DAP). As plantas. Possivelmente clorofila b tenha sido o único pigmento levemente afetado pela doença, no entanto investigação mais detalhada merece ser feita para ratificar a hipótese, já que os pigmentos mantiveram-se preservados, de um modo geral, em todas as plantas.

Revelação em gel de atividade de proteínas relacionadas à patogênese, caso das peroxidases (Fig. 10), confirmou aumento de atividade específica em folhas de plantas submetidas aos tratamentos estudados. Por outro lado, revelação de quitinases (Fig. 9) não reforçou o tênue aumento de atividade provocado pela maioria dos químicos e extratos naturais estudados (Fig. 7), talvez em parte pela subdivisão do total de atividade quitinásica em 4, 5, 6 ou mesmo 7 isoformas. Um padrão isoenzimático levemente heterogêneo foi evidenciado nas eletroforeses, possivelmente justificado pela procedência heterogênea do material. No entanto, uma isoforma provavelmente conservada de quitinase pareceu ser inibida por muitos dos tratamentos estudados, principalmente a 4 e 13 DAP, como pode ser conferido principalmente nos controles pulverizados com água e não inoculados (Fig 9., indicados por setas). Géis revelados para CHI de extratos de folhas tratadas com '30% CPA' e '20% MCp' também evidenciaram a isoforma ativa em seus controles (dados não mostrados).

Ao contrário, géis revelados em condição nativa para atividade de peroxidases de guaiacol puderam confirmar e reforçar o aumento de atividade das amostras avaliadas no ensaio colorimétrico (Fig. 10).

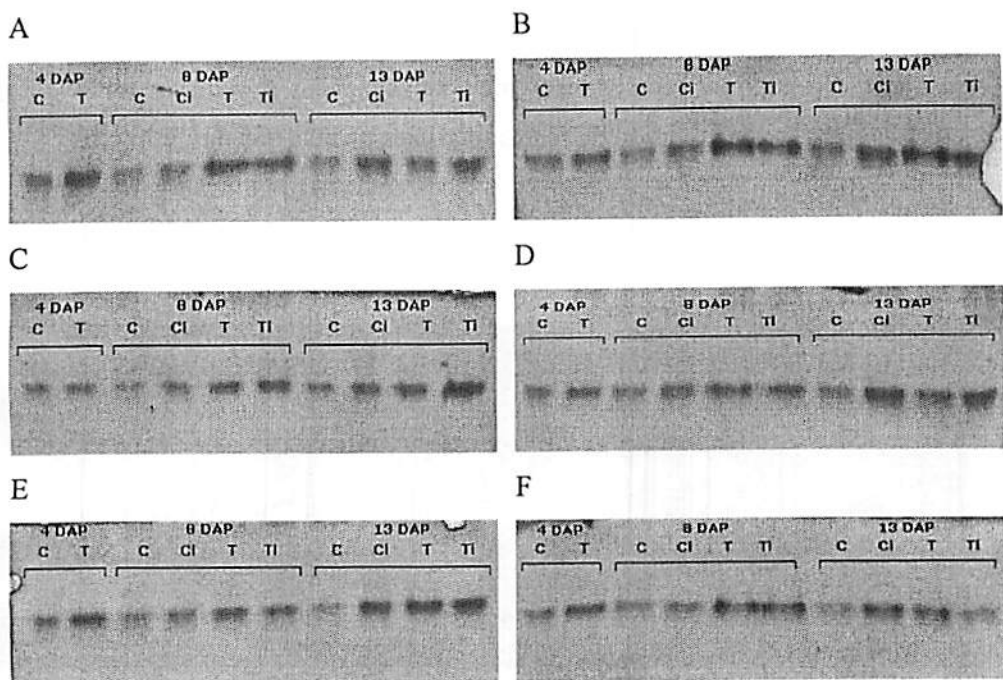


FIGURA 10. Eletroforese em condições nativas revelando isoformas de peroxidases (POX) em plantas pulverizadas com A. ASM, B. Ecolife®, C. '30% EFID', D. '20% MCp', E. enxofre e F. '30% VLA'. Quantidade aproximada de proteína por poço: 8 µg. Tempos: 4 DAP (sadia e tratada); 8 e 13 DAP (sadia, controle inoculado, tratada, e tratada e inoculada).

Amostras de plantas tratadas com '20 % MCp', '30 % VLA', Ecolife®, ASM, '30% EFID', '30% CPA' e enxofre mostraram um perfil de bandas semelhante, quando submetidas a eletroforese, com a revelação de apenas uma isoforma ativa, revelada por diaminobenzidina.

Retornando, por fim, à discussão da queda no teor de fenólicos totais, foi hipotetizado que o desbalanço entre a produção e o consumo de intermediários fenólicos pode ter contribuído para a redução da concentração destes compostos. Atividades incrementadas de enzimas a *downstream* da via de fenilpropanóides



poderiam ter promovido um efeito de dreno sobre os substratos fenólicos solúveis. No entanto, investigações mais aprofundadas devem ser feitas para elucidar as causas da redução de fenóis totais nas plantas tratadas.

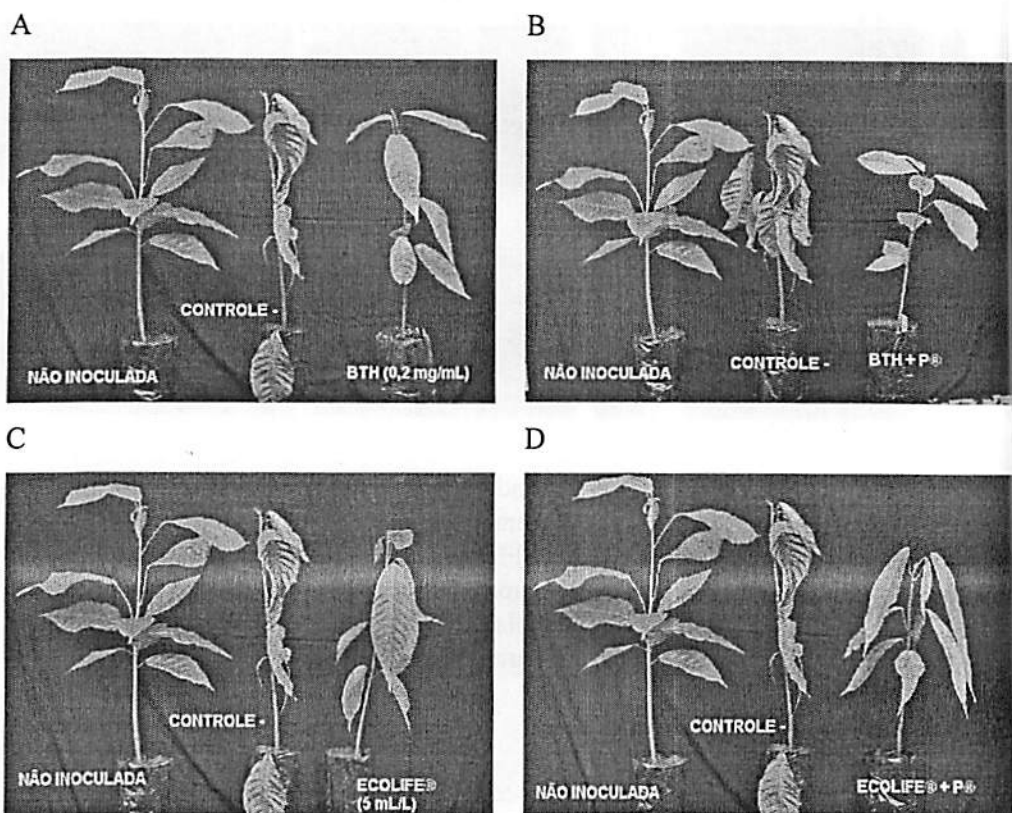
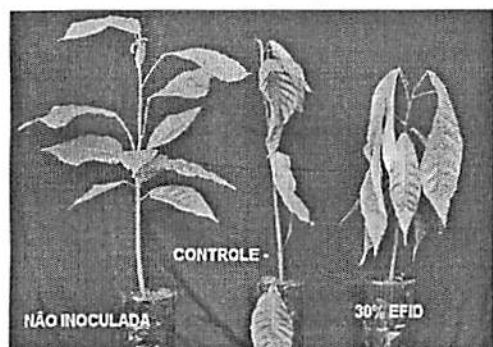
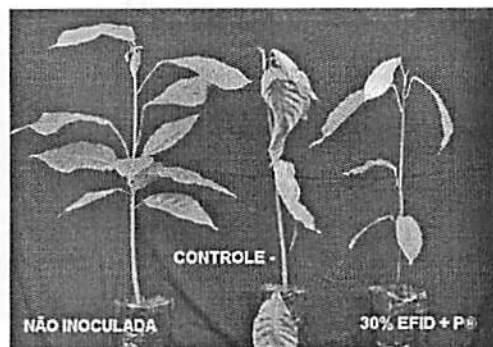


FIGURA 11. Sintomas de murcha, necrose e epinastia causados por *V. dahliae*, em plantas de cacauero a 60 DAI. Respectivamente, testemunha sadia, testemunha inoculada (controle -) e plantas pulverizadas com A. ASM, B. ASM + Pentra-Bark®, C. Ecolife® e D. Ecolife® + P®.

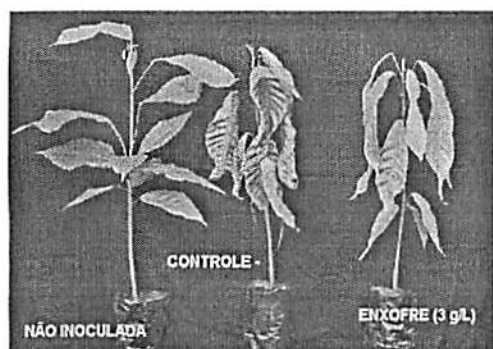
E



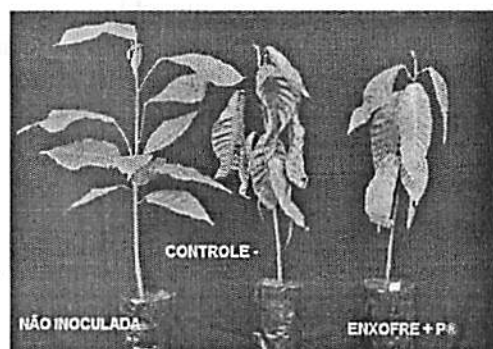
F



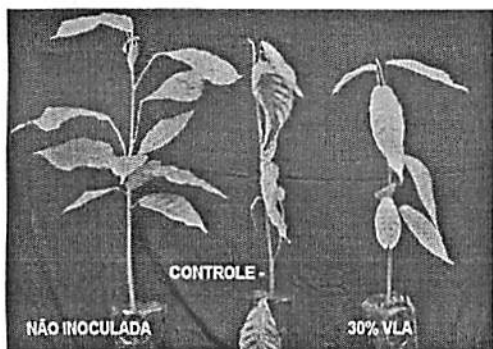
G



H



I



J

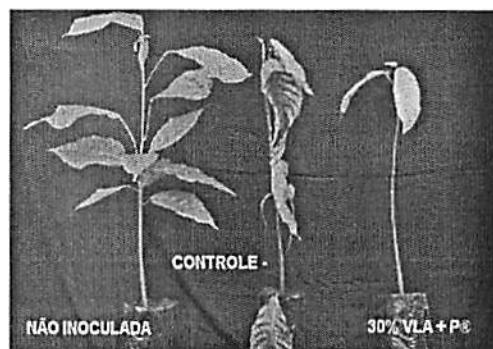


FIGURA 12. Sintomas de murcha, necrose e epinastia causados por *V. dahliae*, em plantas de cacaueteiro a 60 DAI. Respetivamente, testemunha sadia, testemunha inoculada (controle) e plantas pulverizadas com E. '30% EFID', F. '30% EFID' + P®, G. Enxofre, H. Enxofre + P®, I. '30% VLA' e J. '30% VLA' + P®.

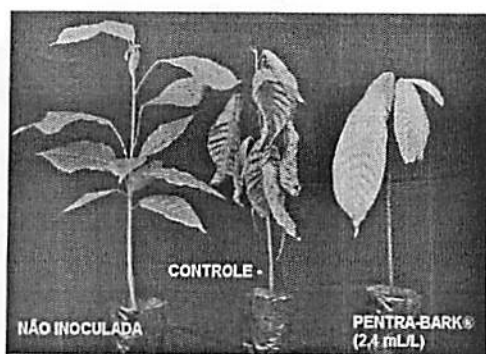


FIGURA 13. Sintomas de murcha, necrose e epinastia causados por *V. dahliae*, em plantas de cacauero a 60 DAI. Respectivamente, testemunha sadia, testemunha inoculada (controle -) e plantas pulverizadas com Pentra-Bark® (2,4 mL L<sup>-1</sup>).

## 6 CONCLUSÕES

ASM, Ecolife®, '30% EFID', enxofre, '30% VLA' e '30% CPM' são capazes de promover relativa eficácia na proteção do cacauero susceptível contra murcha vascular causada por um isolado virulento de *Verticillium dahliae*. O uso de surfactante comercial reduz a performance dos tratamentos estudados.

ASM, Ecolife®, '30% EFID', enxofre, '30% VLA' e '20% MCp' pulverizados em folhas de plântulas de cacauero promovem incremento de atividade de enzimas relacionadas à patogênese, tais como POX, CHI, GLU e deposição significativa de lignina nas folhas marcadamente a 18 DAP, sugerindo indução local de resistência.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, H. A.; ALMEIDA, L. C. C.; LIMA, A. A. Efeito da deficiência hídrica sobre o surgimento da murcha de *Verticillium* no cacaueteiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 8., 1993, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS, 1993. p. 187..

ANFOKA, G. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Vollendung) to *cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, p. 401-405, 2000.

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct, 2002.

AVDIUSHKO, S. A.; YE, X. S.; KUC, J. Detection of several enzymatic activities in leaf prints cucumber plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, n. 6, p. 441-454, June 1993.

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

BUGBEE, W. M.; PRESLEY, T. J. A rapid inoculation technique to evaluate the resistance of cotton to *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 11, p. 1264, Nov. 1967.

DANN, E. K.; DEVERALL, B. J. Activation of systemic disease resistance in pea by a non-avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 324-332, June 2000.

DEETZ, D. A.; JUNG, H. G.; BUXTON, D. R. Water-deficit effects on cell-wall composition and in vitro degradability of structural polysaccharides from alfalfa stems. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 383-388, Mar./Apr. 1996.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley & Sons, 1990. 532 p.

GOY, A. P.; FELIX, G.; MÉTRAUX, J. P.; MEINS, F. Jr. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* X *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive level of  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 1, p. 11-21, July 1992.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. 2. ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p. 329-370.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J. A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores - biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS Press, 1999. p. 37-53.

KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 1439-1458, July 1994.

LEINHOS, V.; BERGMANN, H. Changes in the yield, lignin content and protein patterns of barley (*Hordeum vulgare*) induced by drought stress. **Journal of Applied Botany**, Berlin, v. 69, n. 5/6, p. 206-210, Dec. 1995.

LI, J.; ZINGEN-SELL, I.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by 3-aminobutyric acid and methyl jasmonate. **Journal of Plant Disease Protection**, v. 103, p. 288-299, 1996.

MALECK, K.; LAWTON, K. Plant strategies for resistance to pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 9, n. 2, p. 208-213, Apr. 1998.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 889 p.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate Immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 4, p.: 318-324, Aug. 2002.

PATZLAFF, A.; MCLNNIS, S.; COURTENAY, A.; SURMAN, C.; NEWMAN, L. J.; SMITH, C.; BEVAN, M. W.; MANSFIELD, S.; WHETTEN, R. W.; SEDEROFF, R. R.; CAMPBELL, M. M. Characterisation of a pine MYB

- that regulated lignification. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 743-754, Dec. 2003.
- POMAR, F.; NOVO, M.; BERNAL, M. A.; MERINO, F.; BARCELÓ, A. R. Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 163, n. 1, p. 111-123, July 2004.
- RAJAPPAN, K.; VIDHYASEKARAN, P.; RAGUCHANDER, T. Elicitation of enzyme activity by nickel nitrate in suspension cultured rice. **Plant Disease Research**, St. Paul, v. 10, n. 2, p. 142-145, Feb. 1995.
- RESENDE, M. L. V. **Vascular wilt of cocoa (*Theobroma cacao* L.), caused by *Verticillium dahliae* Kleb. : studies on pathogenicity and resistance**. 1994. Thesis (Ph.D.) - University of Bath, Bath, UK.
- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; AGUILAR, M. A.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (ASM). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, jun. 2000.
- ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, 1999. 45 p. (Cadernos didáticos, 56).
- SADRAS, V. O.; QUIROZ, F.; ECHARTE L.; ESCANDE, A.; PEREYRA, V. R. Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 5, p. 1007-1015, Nov. 2000.
- SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1977.
- STADNIK, M. J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action**. 1999. Thesis (Ph.D.) - University of Hohenheim, Stuttgart.
- STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant

'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens.  
**Biochime, Paris, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.**

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In:  
HAMERSCHMIDT, R.; KUC', J. (Ed.). **Induced resistance to disease in  
plants – developments in plant pathology.** Dordrecht: Kluwer Academic  
Publishers, 1995. p. 86-110. v. 4.



## **CAPÍTULO 5**

### **PROSPECÇÃO DA NATUREZA PROTÉICA DA ELICIAÇÃO EM TOMATEIRO TRATADO COM DIFERENTES FRAÇÕES DE UM EXTRATO NATURAL**

## 1 RESUMO

CAVALCANTI, F. R. Prospecção da natureza protéica da eliciação em tomateiro tratado com diferentes frações de um extrato natural. In: \_\_\_\_\_. **Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos.** 2005. Cap. 5, p. 166-192. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

Uma formulação natural bruta obtida da extração aquosa a frio de pó de tecido necrótico de lobeira (*Solanum lycocarpum*), infectado por *Crinipellis pernicioso* ('30% VLAFF'), demonstrou experimentalmente ser capaz de promover redução significativa no progresso da mancha foliar, quando previamente pulverizado em folhas de tomateiro desafiado por *Xanthomonas vesicatoria*. Tendo em vista a importância da pesquisa de princípios ativos e eliciadores, o presente estudo teve como objetivo iniciar e direcionar o fracionamento do extrato natural, buscando a obtenção de moléculas capazes de promover eliciação de peroxidases de guaiacol, como um indicio de resistência induzida em tomateiro. Frações provenientes do extrato bruto, em diferentes saturações de sulfato de amônio (30%, 45%, 60% e 75%), quando pulverizadas em folhas de tomateiro, promoveram aumento de atividade POX em mais de 200% do controle a 14 HAP. Frações F0/30 e F30/60, apresentaram a maior parte das proteínas do extrato bruto e foram submetidas a cromatografia de troca catiônica. Picos não retidos dessa cromatografia foram, subsequentemente, submetidas a cromatografia de troca aniônica. Todos os picos, retidos e não retidos das duas cromatografias, foram amostrados e pulverizados sobre as plantas. Respostas diferenciais de atividade de POX foram vistas a 14 HAP. As amostras que induziram maiores aumentos de atividade de POX nas plantas foram o pico retido em CM-celulose da F0/30 (F0-30CMR) e o pico retido em DEAE-celulose da F30/60 (F30-60DEAER), justamente as frações que apresentaram quantidade e diversidade de proteínas. No entanto, separação de traços de açúcar redutor nas amostras não foi possível. Os resultados indicaram a viabilidade da continuação deste trabalho, na purificação e na caracterização de moléculas eliciadoras provenientes de 30% VLAFF'.

\* Comitê de Orientação: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

## 2 ABSTRACT

CAVALCANTI, F. R. Perspectives of elicitation in tomato treated with different fraction from a natural extract. In: \_\_\_\_\_. *Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauero por extratos naturais: caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos*. 2005. Cap. 5, p. 166-192. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A crude natural formulation from aqueous cold extract obtained from *S. lycopersum* necrotic tissue ('30% VLAF') promoted experimentally to be capable in reducing disease progress of tomato bacterial leaf spot, when previously sprayed on plants. The present work was aimed to start and drive the fractioning of referred crude extract to discover molecules capable of elicit guaiacol peroxidase activities, as an clue of induced protection on tomato. Fractions from crude extract, in different levels of ammonium sulphate saturation (30%, 45%, 60% and 75%), promoted increase of POX activities reached more than 200% of control plants at 14 HAP. Fractions F0/30 and F30/60 showed the most quantities of proteins from crude extract and were submitted to cation exchange chromatography (CEX). Not retained peaks from these first chromatography were submitted to an anion exchange chromatography (AEX). All peaks, retained and not retained, from both ion exchanges were sampled and sprayed on plants. POX differential responses were verified at 14 HAP. Samples that produced the most POX increases were the retained peak in CEX from F0/30 (F0-30CMR) and the retained peak in AEX from F30/60 (F30-60DEAER). These two samples were just the fractions that showed higher quantity and diversity on proteins. However, sugar traces on samples did not were separated. Results indicate the viability on continuity of this present work to discover eliciador molecules from '30% VLAF' based upon purification and characterization of proteins or carbohydrates.

---

\* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Adviser); Denilson Ferreira de Oliveira – DQI/UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

Respostas fisiológicas em seres vivos baseiam-se em sinalização molecular. Este fenômeno participa de um sem-número de processos metabólicos, que vão desde diferenciação de órgãos, crescimento e desenvolvimento vegetativo, até defesa contra o ataque de patógenos. Elicidores (também conhecidos por eliciadores) são uma classe de sinalizadores que estimulam resposta de defesa nas plantas. Elicidores são reconhecidos por receptores, usualmente ancorados na membrana plasmática, fazendo o disparo de uma cascata de transdução de sinais que levará à ativação de uma rede de mecanismos de defesa. Como detalhado no Capítulo 1, várias classes de compostos estruturalmente distintos, como oligossacarídeos, moléculas lipofílicas, glicoproteínas e peptídeos agem como sinais químicos que são percebidos pelas plantas e induzem elementos envolvidos na resposta de defesa. Esses eliciadores podem ser classificados como exógenos, quando oriundos do patógeno invasor, ou endógenos, quando provenientes da própria planta, em decorrência do ataque do patógeno (Shibuya et al., 2001).

Existem inúmeros relatos de obtenção de eliciadores bem-sucedidos a partir de material biológico. Basse et al. (1992) obtiveram pequenos glicopeptídeos a partir da digestão de uma invertase de levedura por  $\alpha$ -quimiotripsina, que foram altamente ativos na eliciação de etileno e respostas de PAL em células cultivadas de tomateiro. Ham et al. (1991) evidenciaram acúmulo de fitoalexinas em soja eliciada por oligossacarinas (fragmentos) de parede celular de *Phytophthora megasperma*, que também foi alvo de trabalhos pioneiros em purificação e caracterização de eliciadores, com aprecimento de gliceolina em soja tratada com filtrados do mesmo fungo (Ayers et al., 1976). Chang et al. (1995) verificaram acúmulo de mRNA de uma quitinase de ervilha

eliciada por quitosana de *Fusarium* sp. Dubery e Slater (1997) conseguiram indução de resistência em discos foliares de algodão submetidos a eliciadores obtidos de parede celular de *Verticillium dahliae*. Benhamou et al. (1998) obtiveram indução de resistência contra fusariose em tomate pela aplicação combinada de quitosana comercial e bactéria endofítica. N-acetilquitooligosacarídeos e laminarioligosacarídeos foram relatados a eliciar expressão e secreção de quitinases extracelulares e PAL em suspensão de células em arroz (Inui et al., 1996; Inui et al, 1997). Bailey (1995) conseguiu purificar uma proteína (22,5 Kda) de filtrado de cultura de *Fusarium oxysporum* que induziu etileno e necrose em folhas de *Erythroxylum coca*. Outros trabalhos envolvendo eliciadores e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) foram revisados em Nürnberger e Brunner (2002).

No Brasil, Guzzo et al. (1987) purificaram parcialmente polissacarídeos de um filtrado aquoso autoclavado de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* que promoveram redução de doença em conseqüência do tratamento prévio de folhas de cafeeiro desafiado pelo próprio *H. vastatrix*. Os autores testaram diversas frações provenientes do filtrado contra a ação de enzimas hidrolíticas e concluíram uma maior capacidade eliciadora à traços de  $\beta$ -mananas, em lugar de  $\beta$ -glucanas. Em trabalho posterior, foi caracterizado um eliciador de fitoalexina em soja a partir de urediniósporos de *H. vastatrix* (Guzzo e Moraes, 1997).

Trabalhos envolvendo moléculas eliciadoras, parcialmente caracterizadas, foram obtidas de suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavada. Frações retidas em DEAE-celulose promoveram ativação de defesa, em ensaio biológico (Wulff e Pascholatti, 1999). Ação de extrato aquoso proveniente de massa seca de *Lentinula edodes* foi comprovada em pepino desafiado por *Colletotrichum lagenarium*. Frações do extrato aquoso e de um pico eluído de cromatografia de troca iônica foram efetivos na proteção de

plântulas de pepino, com aumento de atividade de peroxidases de fenóis (Di Piero, 2003).

O objetivo do estudo foi iniciar e direcionar processos de separação e purificação de uma ou mais frações de natureza protéica, provenientes de um extrato aquoso a frio de pó de tecido necrosado (vassoura seca) de *Solanum lycocarpum*, capazes de promover o aumento de peroxidases a partir de sua pulverização sobre plantas de tomateiro. Foi considerado o aumento de atividade da enzima oxidativa como uma reação marcadora de possível indução de respostas de defesa.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparo do extrato bruto de *S. lycocarpum*

Conforme descrito no Capítulo 2, tecido caulinar de lobeira (*S. lycocarpum*), arbusto hospedeiro silvestre de *C. pernicioso*, densamente infectado e necrosado por este fungo, foi coletado para secagem a 60°C por 24 horas e posterior trituração seguido de moagem. O sintoma de interesse produzido pela interação patógeno-hospedeiro foi caracterizado pelo superbrotamento de ramos e entrenós, hiperplasia e hipertrofia celular, caracterizando 'vassoura-de-bruxa', em seu estágio de 'vassoura seca'. O pó obtido do tecido necrosado foi armazenado sob refrigeração a 4°C.

120 g do pó obtido foram divididos em 8 alíquotas de 15 g, com cada alíquota sendo ressuspensa em 50mL de água em erlenmeyer de 250 mL. Os erlenmeyers foram então encaminhados e dispostos em agitador orbital, onde sofreram agitação de 130 rpm durante 5 horas. Em seguida o extrato foi filtrados a vácuo em sistema funil com novelo de algodão acoplado a um kitazato, para separação dos resíduos. Por fim, a amostra foi congelada em freezer -20°C para uso experimental, com o tratamento sendo denominado ('30% VLAFF').

### 4.2 Fracionamento por precipitação salina

Após descongelamento da amostra de extrato bruto '30% VLAFF', seguido de breve centrifugação em 300 rpm (rotor Sorvall, GSA) por 7 min., para retirada de resíduos sólidos, o volume total obtido de extrato foi submetido à precipitação por sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ao nível de 0-30%, 0-45%, 0-60% e 0-75% de saturação, durante 12 horas à temperatura de 4 °C: Em seguida, o volume foi centrifugado 8000 rpm (rotor Sorvall, SS-34) durante 30 min., e os precipitados foram separados do sobrenadante e ressuspensos em água grau

Milli-Q, em menor volume possível (10 mL). Os precipitados ressuspensos foram dialisados contra água Milli-Q, durante 24 h, em membrana com limite de exclusão de 12,5 Kda. As amostras foram preparadas (F0/30, F0/45, F0/60 e F0/75) para pulverização sobre folhas de tomateiro de 15 dias.

Após a verificação dos resultados de ativação de peroxidases de folhas de tomateiro pelas frações iniciais, foi procedida nova precipitação salina do extrato bruto, ao nível de 0-30% de saturação durante 12 horas à temperatura de 4 °C. O volume foi centrifugado 8000 rpm (rotor Sorvall, SS-34) durante 30 min., e o precipitado foi separado do sobrenadante e ressuspense em água grau Milli-Q, em menor volume possível (10 mL). O sobrenadante foi encaminhado para aumento de saturação, até 60%, em sulfato de amônio. Centrifugação de 8000 rpm (rotor SS-34) por 30 min. foi imposta à amostra, cujo precipitado foi ressuspense em água Milli-Q, com o sobrenadante descartado. O primeiro precipitado ressuspense (F0/30) e o segundo (F30/60), receberam diálise exaustiva contra água Milli-Q, durante 24 h, em membrana com limite de exclusão de 12,5 KDa, com duas trocas, sendo preparados, em seguida, para pulverização foliar e submissão a cromatografias de troca iônica.

### **4.3 Cromatografia de troca iônica**

As frações obtidas da precipitação salina e dialisadas, F0/30 e F30/60, foram submetidas à cromatografia de troca catiônica (resina de CM-celulose), regenerada com sequência de lavagens com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, HCl 0,5 M, tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5, NaOH 0,5 M e equilibrada com água Milli-Q, em coluna  $\phi = 1,5$  cm e  $h = 3$  cm, aproximadamente. Remoção do material não retido foi feito com água Milli-Q, enquanto a eluição das proteínas retidas foi obtida após aplicação de um gradiente de NaCl (0-1M), preparado em água Milli-Q. As frações obtidas foram lidas a 280 nm. Picos não retidos da cromatografia de troca catiônica foram concentrados por exposição à



pó seco de milho (comercial), dialisados exaustivamente, sob refrigeração, e submetidos à cromatografia de troca aniônica (resina de DEAE-celulose), regenerada com a seqüência de lavagens com tampões, contrária à feita com a resina de CM-celulose. A coluna de  $\phi = 1,5$  cm e  $h = 7$  cm, aproximadamente, foi equilibrada com água Milli-Q. Novamente a remoção do material não retido foi feita com água Milli-Q, enquanto a eluição do material retido foi obtida sob gradiente contínuo de NaCl (0-1M), preparado em água Milli-Q. As frações obtidas foram lidas a 280 nm.

#### **4.4 Pulverização e coleta de material fresco**

Plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada, 15 dias após semeadura, foram pulverizadas com frações (F0/30, F0/45, F0/60, F0/75 e F30/60) de '30% VLAf' e amostras de picos cromatográficos retidos e não retidos, até o ponto de escorrimento. Folhas de plantas tratadas e testemunhas pulverizadas com água (controle) foram coletadas a 14 horas após pulverizações (HAP). Em seguida, as folhas foram homogeneizadas e amostradas, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente utilizadas para determinações bioquímicas.

#### **4.5 Determinações bioquímicas**

Material foliar foi homogeneizado por meio de almofariz e pistilo em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo EDTA 0,1 mM durante 5 minutos, sobre um banho de gelo. Proteína solúvel contida nos extratos foi aferida pelo ensaio de Bradford (1976), usando um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de peroxidases de guaiacol foi determinada pela adição de 25 $\mu$ L do extrato enzimático ajustado para 2 mL de uma solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20mM e peróxido de hidrogênio 20 mM. Após incubação em 30°C por 10 min, a absorbância foi medida a 480 nm

(Urbanek et al., 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD<sub>480</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta 480\text{nm mgP}^{-1} \text{min}^{-1}$ ).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi ensaiada de acordo com Laemmli (1970), usando-se um gel de separação de 12,5 % sobreposto por um gel de empilhamento de 5 %. Extratos enzimáticos foram preparados em presença de azul de bromofenol e glicerol, sendo centrifugados em *spin* antes da corrida. Um volume referente a um valor fixo de 5  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra foi adicionado aos poços do gel de empilhamento.

Determinação de açúcares redutores foi conduzida pelo ensaio colorimétrico de Somogyi-Nelson, usando o cobre divalente como agente oxidante (Nelson, 1944).

#### 4.6 Eletroforese Bidimensional

Após a diálise de 16 h, 2 trocas, dos picos retidos da F0/30 em CM-celulose, e da F30/60 em DEAE-celulose, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram ressolubilizadas com tampão de reidratação, 2-D RHY ( 8M urea, 1M tiourea, 2% CHAPS, 10% glicerol, 2% tampão IPG pH 4-7, e 25 mM DTT), (Rabilloud e Chevallet, 2000). A mistura foi então usada para rehidratar fitas imobilizadas IPG (IPG, 18 cm, pH 3-10) e (IPG, 11 cm, pH 4-7; Amersham Biosciences). As fitas foram cortadas em duas, com duas corridas de 2ª dimensão para cada pedaço, pelo fato da cuba não suportar tiras íntegras de 18 cm.

As amostras (F0/30, pico retido em CM; e F30/60, pico retido em DEAE) foram aplicadas em cada poço da câmara de reidratação. Cada fita IPG foi coberta com 1.5 mL de óleo “Drystrip cover fluid” para minimizar evaporação e cristalização de uréia. As fitas IPG foram reidratadas à temperatura ambiente (20 °C) por toda noite (16 h).

Os parâmetros para focalização isoeletrica foram empiricamente determinados, embora algumas sugestões tenham sido acatadas de acordo com

Gorg (2000). IEF foi conduzida em sistema Multiphor II (Amersham Biosciences), a altas voltagens e baixas correntes ( $<50 \mu\text{A}$ ), acoplado a um circulador termostático, com temperatura regulada a  $19^\circ\text{C}$ . Os parâmetros de focalização programados foram: 100 V/h, 250 V/h, 500 V/h, 1250 V/h e 3500 V por 5 horas. IEF terminou após cerca de 7 horas com um total de voltagem aplicada de 19600 volts. As fitas IPG foram estocadas a  $-80^\circ\text{C}$ . Para equilibrar as fitas IPG foi utilizado o tampão SDS de equilíbrio (Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8 (6,7 mL), uréia (72.07 g), glicerol 69.0 mL), SDS (4 g), azul de bromofenol 1% (200  $\mu\text{l}$ ) e ajustado para o volume total de 200 mL com água grau Milli-Q. O tampão foi estocado em alíquotas de 40 mL a  $-20^\circ\text{C}$ . Antes do uso foram adicionados 200 mg de DTT para 20 mL da solução SDS de equilíbrio. As fitas IPG foram colocadas individualmente em tubos contendo 5 mL do tampão SDS de equilíbrio que foram incubados sob agitação suave por 15 min. Em seguida, a solução foi descartada e o segundo equilíbrio foi feito nas mesmas condições com 500 mg de iodo acetamida em 20 mL de solução SDS de equilíbrio.

Para a corrida da 2<sup>a</sup> dimensão, as fitas IPG e 2  $\mu\text{l}$  do marcador em papel de filtro foram colocadas no topo do gel. As fitas IPG foram cobertas com agarose/SDS. A corrida foi conduzida sob corrente constante, 25 mA por gel, e tensão máxima de 250V, usando um sistema vertical (Hoeffer SE 600, Amersham Biosciences). Proteínas em estudo foram visualizadas por coloração com prata (Blum et al., 1987) após a etapa de fixação de 15 horas em uma solução de 40% etanol e 10% ácido acético.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento prévio do extrato bruto de pó de tecido necrótico de *S. lycorcarpum* foi conduzido nas saturações de 30%, 45%, 60% e 75% em sulfato de amônio. Todos os precipitados ressuspensos e dialisados, quando pulverizados sobre as folhas de tomateiro de 15 dias, foram capazes de induzir o aumento relativo de atividade de peroxidases (Fig. 1).

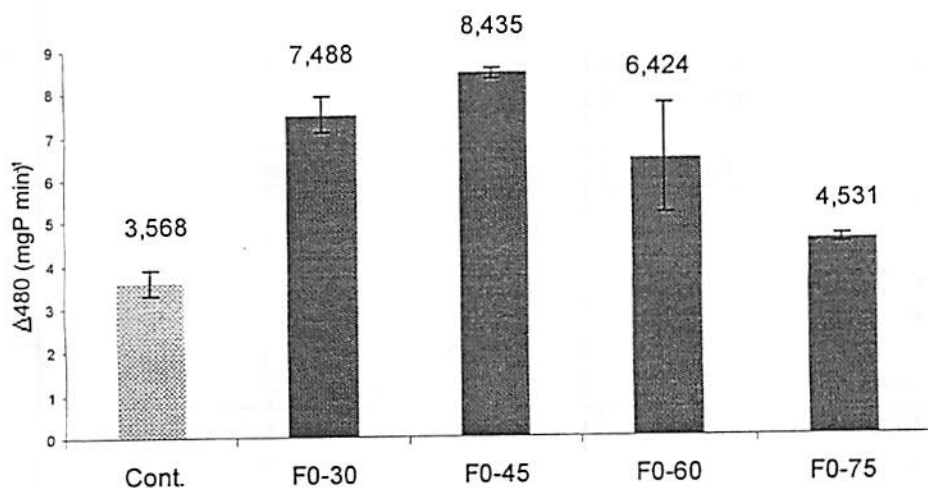


FIGURA 1. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX) em folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, 14 HAP. Plantas controles foram pulverizadas com água destilada. Barras de erros indicam desvio padrão de média de 3 plantas.

Desde já, afirma-se que, na falta de bioensaio em plantas inoculadas com patógeno para verificar efetiva redução de progresso de doença, respostas de atividade de peroxidase são o único indício de alguma resposta de indução de defesa por parte da planta, ativada pelas diferentes frações do extrato bruto, este

confirmado experimentalmente como protetor; vide Capítulo 2. O primeiro passo na continuidade deste trabalho seria o estabelecimento de bioensaio rápido para averiguar a efetiva confirmação das frações testadas sobre um sistema patógeno *versus* hospedeiro dinâmico, posto que aumento de atividade de peroxidases não significa assegurar indução de resistência, muito menos aumento de proteção. De qualquer forma, atividade POX permanece um indício coerente, merecendo ser avaliado.

Teores de proteínas solúveis totais foram dosados em todos os precipitados ressuspensos obtidos (Tabela 1).

TABELA 1. Proteínas solúveis totais dos precipitados salinos de '30% VLAF' ressuspensos e dialisados

<sup>1</sup> Tratamento	Proteínas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
'30% VLAF'	235,7 $\pm$ 3,7
P 30%	111,6 $\pm$ 0,9
P 45%	176,6 $\pm$ 5,6
P 60%	210,3 $\pm$ 8,4
P 75%	234,8 $\pm$ 6,2
P 30-60 <sup>2</sup>	320,5 $\pm$ 0,3

<sup>1</sup> '30% VLAF' foi obtido pela razão de extração 15 g de pó / 70 mL água, em volume final de cerca de 600 mL. Precipitados foram ressuspensos em menor volume possível de água (10 mL).

<sup>2</sup> Proveniente de 2ª extração.

Tendo em vista os resultados de atividade de POX em plantas pulverizadas com o primeiro lote de precipitação salina sobre o '30% VLAF', adotou-se um critério de separação de material por nova precipitação salina. Foi conduzida extração a frio do material, seguida de saturação seqüencial com o sal até a obtenção de 2 frações principais: F0-30 e F30-60. Essas frações foram,

então, submetidas a colunas com matrizes trocadoras de íons, na tentativa de mais um passo de separação molecular sobre o material. Em uma estratégia de separação, freqüentemente adota-se a seqüência dos seguintes tipos de cromatografia, quando a proteína é desconhecida: troca iônica → afinidade → exclusão molecular. No presente estudo, foi abordado o critério usual.

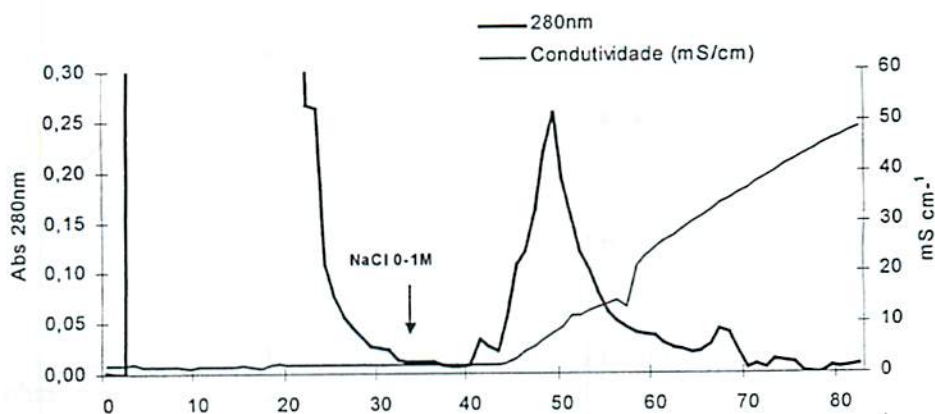


FIGURA 2. Cromatografia de troca catiônica da fração F0/30, obtido a partir de '30% VLAf'. O material foi aplicado em coluna de CM-celulose (1,5 x 3 cm). Tampão de equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. Eluição em gradiente (0-1M) de NaCl, indicado pela condutividade. Fração: 3,1 mL. Fluxo: 93 mL h<sup>-1</sup>. Quantidade de proteína submetida: 11,66 mgP.

A estratégia adotada foi cromatografar a amostra baseando-se na carga relativa de suas moléculas componentes. Inicialmente os precipitados estudados foram submetidos a cromatografias de CM-celulose, separando-se basicamente picos não retidos dos retidos. Em seguida, os picos não retidos dessas cromatografias foram concentrados, novamente dialisados e submetidos à cromatografia de DEAE-celulose. Da cromatografia de troca aniônica foram evidenciados, também, picos retidos e não retidos. Finalmente, as frações

referentes aos picos foram compostas, amostradas, concentradas e dialisadas para pulverização em plantas e análise de atividade POX.

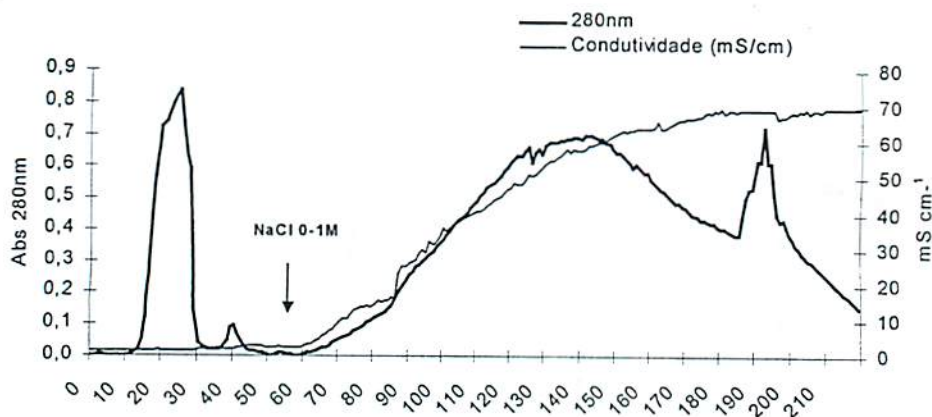
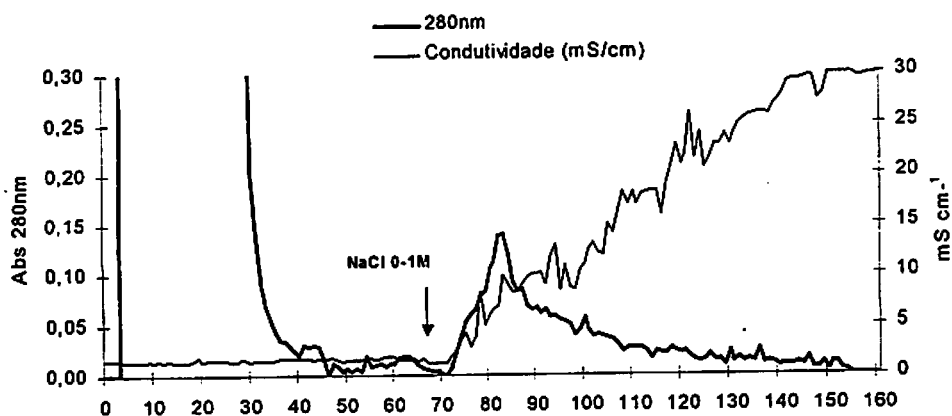


FIGURA 3. Cromatografia de troca aniônica da fração F0/30, obtido a partir de '30% VLAF'. O pico não retido em CM-celulose foi preparado e aplicado em coluna de DEAE-celulose (1,5 x 7 cm). Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Eluição em gradiente (0-1M) de NaCl, indicado pela condutividade. Fração: 2,2 mL. Fluxo: 88 mL h<sup>-1</sup>.

Quando a fração F0/30, contendo atividade eliciadora de POX em plantas de tomateiro, foi submetida à cromatografia de troca catiônica em coluna de CM-celulose (1,5 x 3 cm), dois picos foram obtidos (Fig. 2). O primeiro foi retirado com o tampão de equilíbrio, amostrado, dialisado exaustivamente e preparado para submissão à cromatografia de troca aniônica. O segundo pico (F0-30CMR), frações 44 a 60, foi eluído logo após início do gradiente de NaCl, a partir da fração 35. O rendimento em concentração de proteína eluída foi baixo, em torno de 10 µg mL<sup>-1</sup>, segundo dosagem a 595 nm. No entanto, bandas foram reveladas normalmente em gel corado por prata (Figs. 6-8).

A



B

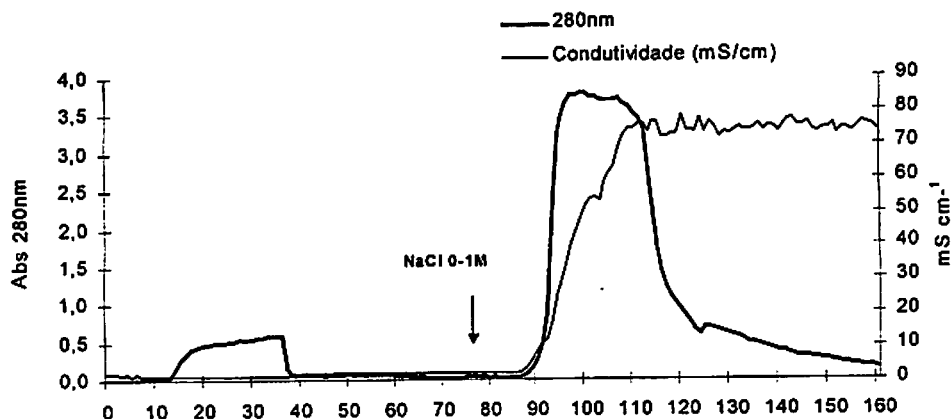


FIGURA 4. A. Cromatografia de troca catiônica da fração F30/60, obtido a partir de '30% VLAF'. O material foi aplicado em coluna de CM-celulose (1,5 x 3 cm). Tampão de equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. Eluição em gradiente (0-1M) de NaCl, indicado pela condutividade. Fração: 1,5 mL. Fluxo: 30 mL h<sup>-1</sup>. Quantidade de proteína submetida: 25,67 mgP. B. Cromatografia de troca aniônica da fração F30/60, obtido a partir de '30% VLAF'. O pico não retido em CM-celulose foi preparado e aplicado em coluna de DEAE-celulose (1,5 x 7 cm). Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Eluição em gradiente (0-1M) de NaCl. Fração: 2,9 mL. Fluxo: 50 mL h<sup>-1</sup>.



Subseqüentemente, o volume não retido da F0/30 da CM-celulose foi aplicada em uma coluna de DEAE-celulose (Fig 3). Quatro picos (F0-30DEAEPI, F0-30DEAEPII, F0-30DEAEPIII, F0-30DEAEPIV) foram obtidos, sendo que o primeiro, frações 13 a 30, e o segundo, frações 37 a 49 foram retirados com o tampão de equilíbrio. Após a aplicação do gradiente de NaCl, foram eluídos mais 2 picos, não bem distintos, entre as frações 75 e 180, e 184 a 197. Grande parte da pigmentação residual no volume não retido da F0/30 em CM-celulose ficou retida na resina trocadora. Presumidamente, a pigmentação interferiu de forma substancial na separação das proteínas contidas na amostra. De qualquer forma, os picos foram separados, amostrados e preparados para pulverização em planta.

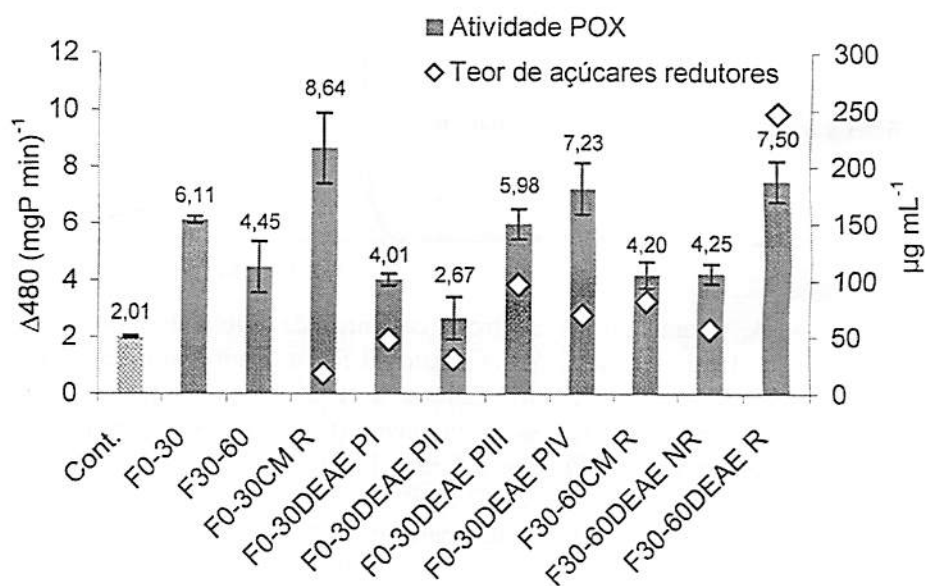


FIGURA 5. Atividade de peroxidases de guaiacol (POX) e teores de açúcares redutores (losangos) em folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, 14 HAP. Plantas controles foram pulverizadas com água destilada. Barras de erros indicam desvio padrão de média de 3 plantas.

De modo análogo, a fração F30/60 também contendo atividade eliciadora de POX em plantas de tomateiro, foi submetida à cromatografia de troca catiônica em coluna de CM-celulose (1,5 x 3 cm). Dois picos foram obtidos (Fig. 4A). O primeiro foi retirado com o tampão de equilíbrio e preparado para submissão à cromatografia de troca aniônica. O segundo pico (F30-60CMR), frações 73 a 108, foi retirado logo após início do gradiente de NaCl, a partir da fração 43. Todos os volumes eluídos de colunas, provenientes da fração F30/60 apresentaram-se pigmentados. O volume não retido da F30/60 em CM-celulose foi aplicada em uma coluna de DEAE-celulose (Fig 4B). Dois picos (F30-60DEAENR e F30-60DEAER) foram obtidos, sendo que o primeiro, frações 13-58, foi retirado com o tampão de equilíbrio. Após a aplicação do gradiente de NaCl, foi eluído mais um pico, nas frações 88 a 139. Com relação à separação feita a partir da F30/60, todas as amostras apresentaram pigmentação. Contudo, assim como na fração F0/30, os pigmentos apresentaram atração por resina carregada positivamente.

Os produtos de separação, provenientes do fracionamento do '30% VLAf' foram então pulverizados no tomateiro, ao final da tarde. A análise de POX das folhas coletadas 14 HAP, bem como a determinação do teor de açúcares redutores estão apresentadas na Fig. 5. Plantas pulverizadas com as frações F0/30 e F30/60, como esperado, responderam com aumento de atividade enzimática. Plantas pulverizadas com alíquotas dos picos F0-30CMR e F30-60DEAER responderam com números bastante mais altos de atividade POX, chegando a atingir 430% e 370% do controle, respectivamente. Plantas expostas aos picos retidos F0-30DEAEP III e F0-30DEAEP IV também ativaram POX mais do dobro do nível do controle pulverizado com água.

Alíquotas de picos e frações contendo atividade eliciadora de POX em tomateiro foram submetidas à eletroforese, sob condições desnaturantes, em gel de poliacrilamida. Os perfis estão apresentados nas Figs. 6-8.

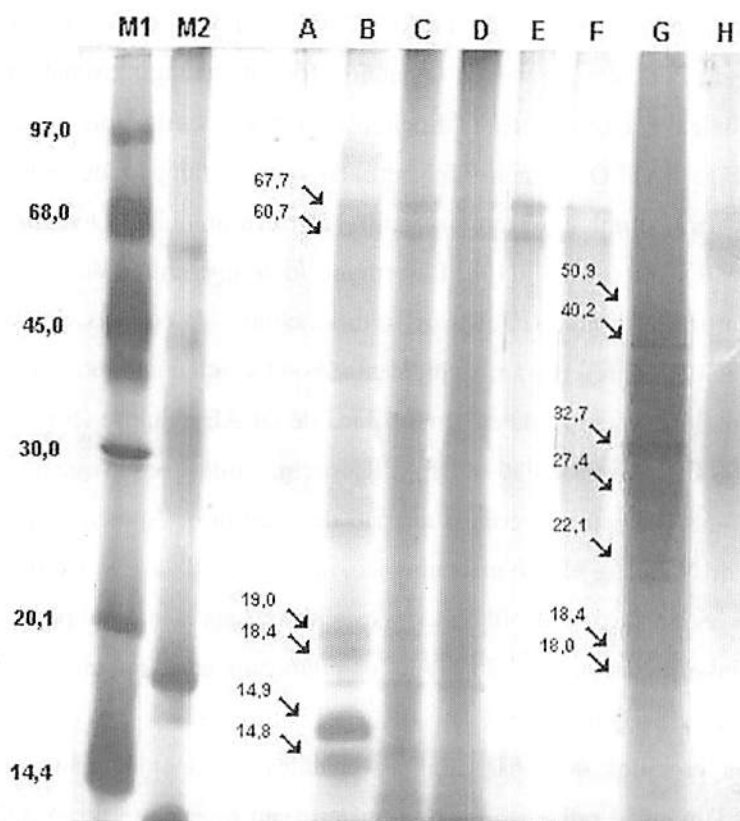


FIGURA 6. SDS-PAGE redutora e desnaturante. M = Marcador (KDa). Poço A. F30-60CMR, B. F0-30CMR, C. F30-60DEAENR, D. F0-30DEAEPI, E. F0-30DEAEPII, F. F0-30DEAEPIII, G. F30-60DEAER, H. F0-30DEAEPIV. Setas indicam bandas protéicas de maior destaque. Quantidade de proteína aplicada: ~5  $\mu$ g.

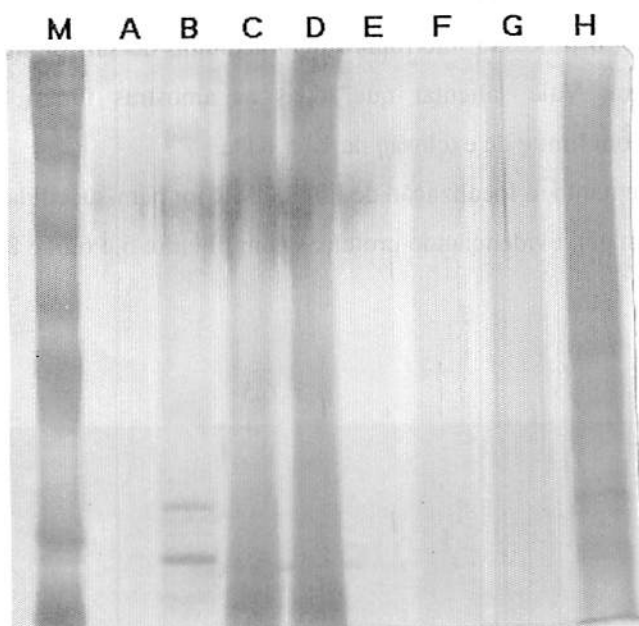


FIGURA 7. SDS-PAGE desnaturante. M = Marcador. Poço A. F30-60CMR, B. F0-30CMR, C. F30-60DEAENR, D. F0-30DEAEPI, E. F0-30DEAEPII, F. F0-30DEAEPIII, G. F0-30DEAEPIV, H. F30-60DEAER. Setas indicam bandas protéicas de maior destaque. Quantidade de proteína aplicada: ~5 µg.

Alíquotas de picos que se mostraram mais promissoras na eliciação de respostas POX em tomateiro a 14 HAP, F0-30CMR e F30-60DEAER, foram exatamente as que evidenciaram maior quantidade e diversidade de proteínas. A revelação da amostra altamente pigmentada F30-60DEAER em gel se mostrou problemática, na medida em que os pigmentos das amostras interferiram no coramento por prata. Coramento por Comassie Brilliant Blue R-250 foi experimentado sem sucesso, dada a baixa concentração de proteína nas amostras. Possivelmente, a pigmentação presente na alíquota do pico em questão tenha impossibilitado a focalização isoeletrica que antecede a corrida em 2ª

dimensão no gel. Tentativas foram feitas para focalizar F30-60DEAER, sem sucesso, com o processo interrompido pelo acúmulo de sais/pigmentos na parte ácida da tira. Vale salientar que todas as amostras foram dialisadas em membrana com limite de exclusão de 12,5 KDa.

No entanto, a focalização de F0-30CMR foi bem-sucedida, com os *spots* revelados em gel, evidenciando proteínas com pI entre 5 e 6,5; e 8 (Fig. 8).

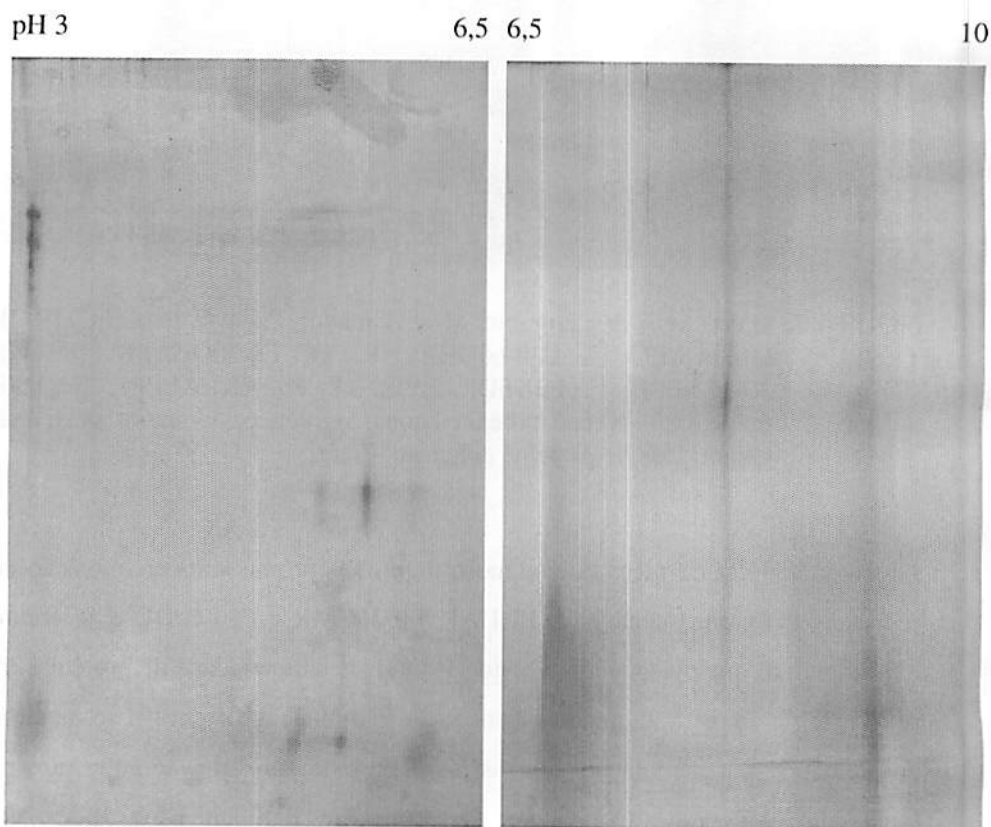


FIGURA 8. Eletroforese bidimensional do pico F0-30CMR. IEF conduzida em gradiente linear de pH (Fita de 18 cm, pH 3-10,  $\Delta\text{pH} = 0,54 \text{ UpH cm}^{-1}$ ). Gel revelado com prata. Quantidade de proteína aplicada:  $\sim 10 \mu\text{g}$ .

Eletroforese bidimensional foi utilizada para refinar a análise dos picos retidos das frações F0/30 e F30/60 em cromatografias de troca iônica. O sistema 2D-PAGE separa proteínas baseadas na carga, conforme seus PI's, na 1ª dimensão, através de uma corrida IEF (focalização isoelétrica), e uma outra corrida em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na 2ª dimensão, separando as proteínas conforme seus pesos moleculares.

Deste ponto do trabalho em diante, à luz dos resultados, sugerem-se dois caminhos, um para F0-30CMR e outro para F30-60DEAER. Para análise e purificação das proteínas contidas em F0-30CMR o trajeto é mais curto, posto que o resultado de incremento de POX possui maior possibilidade de ter sido influenciado por uma proteína, em que pese o reduzido teor de açúcares redutores encontrado nesta amostra (Fig. 5). Além disso, houve um passo considerável de purificação logo após a submissão da F0/30 em uma coluna de troca catiônica. Dados gerados pela eletroforese 2D poderiam ser aproveitados para próximos passos de purificação, empregando-se cromatofocalização. Para análise das muitas proteínas contidas em F30-60DEAER, sugere-se nova extração a partir do material bruto de '30% VLAF', visando à separação dos pigmentos das proteínas, além da separação de proteínas e traços de carboidratos que foram evidenciados como contaminantes.

Análise de peptídeos, investigando-se o trocador da diálise, e carboidratos também poderia ser conduzida a partir de extrações de '30% VLAF'. Peptídeos e carboidratos não foram alvo de investigação no presente trabalho, no entanto, indubitavelmente, possuem a mesma importância como candidatos a eliciadores.

Entretanto, antes de qualquer ação no sentido do aprofundamento do conhecimento sobre o potencial das proteínas candidatas a eliciadores de POX apresentadas, a fixação de bioensaios dinâmicos e a confirmação de redução de progresso de doença em plantas desafiadas por patógenos, pré-imunizadas com

as frações estudadas, é imprescindível para atribuir sentido ao trabalho de continuidade, já que aumento de atividade de POX não garante indução de resistência *per se*.

Trabalhos agronômicos envolvendo purificação de eliciadores têm, no bojo, o escopo da utilização de seu princípio ativo em algum produto comercial. Muito conhecido é o aproveitamento da harpina, como um fator de patogenicidade protéico sintetizado por *Erwinia amylovora* (Adam et al. 1997; Jin et al., 1997), cujo gene foi clonado em *E. coli* para produção em larga escala. O pacote comercial Messenger® utiliza este esquema biológico para realizar a função de indução de resistência de não hospedeiro. Outros produtos valem-se, não de produtos protéicos, mas de eliciadores como quitosana e oligossacarídeos.

Estudos subseqüentes devem ser conduzidos para averiguar se existe alguma molécula eliciadora, proteína ou oligossacarídeo, proveniente de extrato aquoso de pó de tecido necrótico de *S. lycocarpum*, que possa ser viável a compor algum produto comercial, no futuro.

## 6 CONCLUSÃO

Extrato aquoso a frio de vassoura de *S. lycocarpum* pode ser fracionado por precipitação salina e cromatografia de troca iônica. Frações obtidas são capazes de eliciar diferencialmente atividade de peroxidases de guaiacol, quando pulverizadas em plantas de tomateiro.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, A. L.; PIKE, S.; HOYOS, M. E.; STONE, J. M.; WALKER, J. C.; NOVACKY, A. Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 853-861, Oct. 1997.
- AYERS, A. R.; EBEL, J.; FINELLI, F.; BERGER, N.; ALBERSHEIM, P. Host-Pathogen Interactions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 57, n. 5, p. 751-779, 1976.
- BASSE, C. W.; BOCK, K.; BOLLER, T. Elicitors and suppressors of defense response in tomato cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 15, p. 10258-10264, May 1992.
- BAILEY, B. A. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 10, p. 250-255, Oct. 1995.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, Berlin, v. 204, n. 2, p. 153-168, Feb. 1998.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Deerfield Beach, v. 8, n. 2, p. 93-99, Feb. 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CHANG, M.; HOROVITZ, D.; CULLEY, D.; HADWIGER, L. A. Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 105-111, Apr. 1995.
- DI PIERO, R. M. Purificação parcial de eliciadores de peroxidases em plântulas de pepino, isolados a partir de *Lentinula edodes* com atividade protetora contra

*Colletotrichum lagenarium*. In: \_\_\_\_\_. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e purificação parcial dos compostos biologicamente ativos**. 2003. 157 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DUBERY, I. A.; SLATER, V. Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 44, n. 8, p. 1429-1434, Aug. 1997.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Berlin, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, Apr. 2000.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, dez. 1987.

GUZZO, S. D.; MORAES, W. B. C. Purificação e caracterização parcial de um eliciador de fitoalexina em soja, a partir de urediniosporos de *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 396-402, set. 1997.

HAM, K. S.; KAUFFMANN, S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. A soybean Pathogenesis-Related protein with  $\beta$ -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 4, n. 6, p. 545-552, Nov./Dec. 1991.

INUI, H.; YAMAGUCHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; KAWAGUCHI, S.; YAMADA, T.; IHARA, H.; HIRANO, S. Three extracellular chitinases in suspension-cultured rice cells elicited by N-acetylchitooligosaccharides. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 12, p. 1956-1961, Dec. 1996.

INUI, H.; YAMAGUCHI, Y.; HIRANO, S. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and l-Phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 6, p. 975-978, Dec. 1997.

JIN, Q. L.; LIU, N. Z.; QIU, J. L.; LI, D. B.; WANG, J. A truncated fragment of harpin Pss induces systemic resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* in

rice. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, n. 4, p. 243-257, Oct. 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

NELSON, N. A phometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, p. 375-381, 1944.

RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. In: RABILLOUD, T. (Ed.) **Proteome research two-dimensional gel electrophoresis and identification methods**. Germany: Springer-Verlag, 2000.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E. 2001. Oligosaccharides signalling for defences responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 223-233, 2001.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

WULFF, N. A.; PASCHOLATTI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Sacharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 428-435, set. 1999.