

**ATIVIDADE DE QUITOSANAS E DA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA DE BABOSA PARA O CONTROLE DA
MANCHA BACTERIANA (*Xanthomonas gardneri*) E PINTA
PRETA (*Alternaria solani*) EM PLANTAS DE TOMATE**

DANILA SOUZA OLIVEIRA COQUEIRO

Florianópolis
2010

**ATIVIDADE DE QUITOSANAS E DA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA DE BABOSA PARA O CONTROLE DA
MANCHA BACTERIANA (*Xanthomonas gardneri*) E PINTA
PRETA (*Alternaria solani*) EM PLANTAS DE TOMATE**

DANILA SOUZA OLIVEIRA COQUEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para
obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Biotecnologia
Agroflorestal

ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBSON
MARCELO DI PIERO

Florianópolis
2010

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

“Atividade de quitosanas e da fração polissacarídica de babosa para o controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em plantas de tomate.”

POR

DANILO SOUZA OLIVEIRA COQUEIRO

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:



Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero
FIT/CCA/UFSC

Comissão Examinadora:



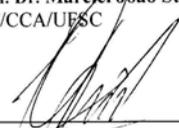
Prof. Dr. Marcelo Maraschin
FIT/CCA/UFSC



Prof. Dr. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada
CCA/Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Marciel João Stadnik
FIT/CCA/UFSC



Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Fevereiro de 2010

À minha família, meu maior tesouro...

A Raildo pelo amor e amizade. Companheiro admirável de imensa dedicação, simplicidade e paciência!

Aos meus pais João e Nelzita, exemplos de sabedoria e determinação, pelo amor incondicional!

Às minhas irmãs Daniela e Daniani pelo carinho e por todo incentivo e apoio. Vocês são dignas de admiração!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me possibilitar superar cada obstáculo com os quais me deparo ao longo da jornada.

Ao professor Dr. Robson Marcelo Di Piero, pela orientação em cada etapa do trabalho; pela paciência, por nunca ter medido esforços para me auxiliar no desenvolvimento das atividades. A minha gratidão pela confiança e incentivo durante todo o curso do mestrado e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin, exemplo de presteza e dedicação, sempre disposto a me auxiliar no que fosse preciso. Agradeço pela colaboração em várias etapas do trabalho e por ter aceitado ser membro relator da banca examinadora.

Aos Professores Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada, Dr. Marciel João Stadnik e Dr. Maurício Sedrez dos Reis, por terem aceitado participar da banca examinadora.

À Dra. Alice Maria Quezado Duval pela gentileza na devida identificação do isolado bacteriano (*Xanthomonas gardneri*);

À Fernanda Ramlov pela auxílio em algumas etapas desse trabalho.

Ao prof. Antonio Carlos de Oliveira, por ter me guiado nos primeiros passos na pesquisa científica. Meus sinceros agradecimentos por todo apoio e incentivo ao longo da minha caminhada acadêmica.

Aos amigos Zamira, Mateus, Bruno, Adriele, Valdenir, Maíra e Suzeli pelas trocas de conhecimentos no laboratório, auxílios e, sobretudo, pela amizade e momentos agradáveis compartilhados.

À amiga Darlene pelas “viradas” de noites sem dormir estudando para disciplinas do curso, por muito ter me ensinado com sua sabedoria e simplicidade.

Às minhas irmãs de coração Tássia e Roberta, que pelo convívio intenso nesses anos tornaram a distância dos meus familiares suportável, por terem me acolhido em suas vidas com carinho.

Ao Laboratório de Fitopatologia, no qual desenvolvi todo trabalho experimental e à bióloga Silvia, pelos serviços prestados.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade.

Ao Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pelo apoio financeiro.

À Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento do projeto.

A todas as pessoas não citadas, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

RESUMO

Coqueiro DSO. **Atividade de quitosanas e da fração polissacarídica de babosa para o controle da mancha bacteriana (*xanthomonas gardneri*) e pinta preta (*alternaria solani*) em plantas de tomate.** Florianópolis; 2010. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC].

O polissacarídeo quitosana tem demonstrado potencial para o controle de doenças em plantas, e a babosa apresenta em sua composição substâncias que exibem propriedades antimicrobianas e podem atuar como eliciadores na indução de mecanismos de defesa das plantas. O presente trabalho foi conduzido com o intuito de verificar o efeito da quitosana no controle de duas importantes manchas foliares do tomateiro: mancha bacteriana e pinta preta. Adicionalmente, observou-se a atividade de uma fração polissacarídica da babosa (FPA) sobre *Xanthomonas gardneri* e no controle da doença. Utilizou-se uma quitosana comercial (Qcom), uma de baixo (Qbpm) e outra de médio peso molecular (Qmpm) e evidenciou-se um efeito antimicrobiano desses polissacarídeos sobre *X. gardneri* e *Alternaria solani*. Houve uma proteção média das plantas contra a mancha bacteriana de 67 %, conferida pelas quitosanas, com os melhores resultados obtidos com a Qbpm a 3 mg/mL, aplicada aos 3 dias antes da inoculação com a bactéria. O perfil espectrofotométrico de plantas tratadas com Qbpm mostrou um aumento da absorvância entre os comprimentos de onda de 280-300 nm, indicando que a quitosana pode ter induzido as plantas a sintetizarem diferentes classes de compostos em resposta à fitobactéria. A análise de compostos fenólicos totais e flavonóides corroboram os resultados obtidos na varredura espectrofotométrica, mostrando aumento significativo desses metabólitos aos 3 dias após a inoculação. Análises enzimáticas mostraram aumento na atividade de peroxidases e fenilalanina amônia-liase em plantas tratadas com a Qbpm. Não foi observado controle da pinta preta pelas quitosanas. Quanto à atividade da FPA, não houve um efeito antimicrobiano sobre *X. gardneri*, em contrapartida, o perfil espectrofotométrico de plantas tratadas com a FPA mostrou um aumento da absorvância entre os comprimentos de onda de 420-455 nm, o que pode ter implicado num aumento da biossíntese de compostos como os carotenóides. Os resultados do presente trabalho indicam a capacidade da quitosana de atuar diretamente sobre os patógenos bacteriano e fúngico estudados e que o controle da mancha bacteriana em plantas de tomate pode ter ocorrido

tanto por essa atividade antimicrobiana da quitosana sobre a bactéria como pela indução de mecanismos de defesa na planta.

Palavras-chave: Mancha bacteriana, metabólitos secundários, indução de resistência, proteínas relacionadas à patogênese, quitosana.

ABSTRACT

Coqueiro DSO. **Activity of chitosan and of a polysaccharidic fraction from aloe to control the bacterial spot (*Xanthomonas gardneri*) and early blight (*Alternaria solani*) of tomato plants.**

The polysaccharide chitosan has demonstrated potential to control diseases in plants, and the aloe presents substances with antimicrobial properties which can act as elicitors in the induction of defense mechanisms of the plants. The objective of this study was to verify the effect of chitosan in the control of two important diseases of tomato: bacterial spot and early blight. Additionally, the activity of a polysaccharidic fraction from aloe (FPA) was observed on *Xanthomonas gardneri* and in the control of disease. A commercial chitosan (Qcom), and another of low (Qbpm) and medium (Qmpm) molecular weight were evaluated on *X. gardneri* and *A. solani* and on the diseases caused by these plant pathogens. The average protection of the plants against the bacterial spot was 67%, checked by the chitosans, with the best results obtained with Qbpm to 3 mg/ml, applied 3 days before the inoculation with the bacteria. The spectrophotometric profile of plants sprayed with Qbpm showed an increase of the absorbance among the wavelengths of 280-300 nm, indicating that the chitosan can have conditioned the plants to synthesize different classes of compounds in response to the bacteria. The analysis of total phenolic compounds and flavonoids corroborate the results obtained in the spectrophotometric wavelength scan, showing significant increase of those metabolites 3 days after the inoculation. Enzymatic analyses showed increase of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in plants sprayed with Qbpm. Control of early blight was not observed with the chitosans. There was not an effect antimicrobial of FPA on *X. gardneri*, by the other hand, the spectrophotometric profile of plants sprayed with FPA showed an increase of the absorbance among the wavelengths of 420-455 nm, which may have implied an increase in the biosynthesis of compounds such as the carotenoids. The results of the present study indicate the capacity of chitosan to act directly on the bacterial and

fungic pathogens. Also, the control of the bacterial spot in tomato plants may have occurred due to the antimicrobial activity of chitosan on the bacteria as well as to the induction of defense mechanisms in the plants.

Keywords: Bacterial spot, secondary metabolites, resistance induction, pathogenesis-related proteins, chitosan.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Área cultivada (hectares) e produção (toneladas) de tomate para as regiões do Brasil no ano de 2007.....	4
Tabela 2 -	Valores médios de absorvância na faixa entre 280 e 300 nm em plantas de tomate tratadas, e inoculadas ou não com <i>Xanthomonas gardneri</i> , 4 dias após o tratamento (T4).....	38
Tabela 3 -	Proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana pela fração polissacarídica de <i>Aloe barbadensis</i> . Os dados se referem ao percentual de redução da severidade da doença em relação ao controle.....	56
Tabela 4 -	Valores médios de absorvância em plantas tratadas com fração polissacarídica da babosa (FPA, 3 mg/mL), e inoculadas (+) ou não (-) com <i>Xanthomonas gardneri</i> , em duas faixas de comprimentos de ondas oriundas da varredura espectrofotométrica.....	58
Tabela 5 -	Atividade antifúngica das quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm sobre a germinação de conídios e alongamento do tubo germinativo de <i>Alternaria solani</i>	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema do pré-condicionamento (adaptado de CONRATH et al., 2002). O tratamento com ácido salicílico (AS), ácido β -aminobutírico (BABA), ácido dicloisonicotínico (INA) ou acibenzolar-S-metil (ASM) pré-condiciona as células vegetais a reagirem mais rápida e eficientemente a um ataque subsequente de patógenos ou estresse abiótico. (a) Etapas do pré-condicionamento, (b) estresse biótico ou abiótico, (c) resposta de defesa potencializada..... 14
- Figura 2 - Estrutura da quitina e quitosana (adaptado de MAJETI e KUMAR, 2000)..... 17
- Figura 3 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), utilizadas a 4 mg/mL, no crescimento *in vitro* de *Xanthomonas gardneri* representado pela densidade óptica da suspensão de células a 600 nm. As quitosanas e o controle HCl 0,05N foram incorporados no meio de cultura nutriente-ágar (NA). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância..... 31
- Figura 4 - Atividade antimicrobiana *in vitro* da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Xanthomonas gardneri* representado pela densidade óptica da suspensão celular a 600 nm. As quitosanas e o controle HCl 0,05N foram incorporados no meio de cultura nutriente-ágar (NA). Os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis e a comparação entre os tratamentos feita de forma independente pelo teste Mann-Whitney para $p < 0,05$ 32
- Figura 5 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), a 1 mg/mL, na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*). HCl 0,05 (pH 5,6) representa o controle negativo e o Acibenzolar-S-metil (ASM), a 50 mg/mL, o controle positivo. Os tratamentos foram aplicados nas plantas 3 dias antes

- da inoculação com a bactéria (10^8 ufc/mL) e a avaliação da severidade da doença feita 15 dias após a inoculação. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância..... 33
- Figura 6 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), a 1 mg/mL, na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*; 10^8 ufc/mL). As quitosanas foram pulverizadas em diferentes intervalos antes da inoculação. HCl 0,05 (pH 5,6) representa o controle negativo aplicado 72 h antes da inoculação. A avaliação da severidade da doença foi realizada 15 dias após a inoculação. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância..... 34
- Figura 7 - Efeito de concentrações (0; 0,75; 1,5; 3,0 mg/mL) da quitosana comercial, de baixo peso e médio peso molecular na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*; 10^8 ufc/mL). Os tratamentos foram aplicados 3 dias antes da inoculação e a avaliação realizada aos 15 dias após a inoculação. Linhas verticais no gráfico representam o desvio-padrão. Houve efeito de concentração das quitosanas sobre a mancha bacteriana pelo teste F a 5%.. 35
- Figura 8 - Efeito de intervalos de tempo entre os tratamentos [quitosana baixo peso molecular (Qbpm), a 3 mg/mL; Acibenzolar-S-metil (ASM), a 50 mg/L; e HCl 0,05N (pH 5,6)] e a inoculação, na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*; 10^8 ufc/mL). O HCl 0,05N, utilizado como controle, foi aplicado 6 dias antes da inoculação. A avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância..... 36
- Figura 9 - Perfil espectrofotométrico de plantas tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm), Acibenzolar-S-metil (ASM) e HCl 0,05 N (pH

- 5,6), inoculadas ou não com *X. gardneri* (Xg; 10^8 ufc/mL), 1 (A), 3 (B), 4 (C) e 6 (D) dias após os tratamentos. T0 = testemunha absoluta..... 37
- Figura 10 - Alteração no conteúdo de compostos fenólicos totais, expresso em μg de equivalente ácido gálico (EAG) por massa fresca (MF), em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm a 3 mg/mL - \diamond , \blacklozenge), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - \square , \blacksquare) ou HCl 0,05 N (\triangle , \blacktriangle) e inoculadas (\blacklozenge , \blacksquare , \blacktriangle) ou não (\diamond , \square , \triangle) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Dentro de cada dia de avaliação, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância..... 39
- Figura 11 - Alteração no conteúdo de flavonóides, expresso em μg de equivalente quercetina (EQ) por massa fresca (MF) em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular a 3 mg/mL (Qbpm), acibenzolar-S-metil a 50 mg/L (ASM) ou HCl 0,05 N e inoculadas ou não com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL) 3 dias após o tratamento. Barras de erros indicam o desvio padrão. O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle (HCl+Xg) pelo teste Dunnet a 5 % de significância..... 40
- Figura 12 - Atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm a 3 mg/mL - \diamond , \blacklozenge), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - \square , \blacksquare) ou HCl 0,05 N (\triangle , \blacktriangle) e inoculadas (\blacklozenge , \blacksquare , \blacktriangle) ou não (\diamond , \square , \triangle) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste F em nível de 5% de significância..... 41
- Figura 13 - Atividade de peroxidases em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular

- (Qbpm a 3 mg/mL - \diamond , \blacklozenge), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - \square , \blacksquare) ou HCl 0,05 N (\triangle , \blacktriangle) e inoculadas (\blacklozenge , \blacksquare , \blacktriangle) ou não (\diamond , \square , \triangle) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Dentro de cada dia de avaliação, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância..... 42
- Figura 14 - Atividade de glucanases em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm a 3 mg/mL - \diamond , \blacklozenge), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - \square , \blacksquare) ou HCl 0,05 N (\triangle , \blacktriangle) e inoculadas (\blacklozenge , \blacksquare , \blacktriangle) ou não (\diamond , \square , \triangle) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste F em nível de 5% de significância..... 43
- Figura 15 - Crescimento de *Xanthomonas gardneri* em meio NA acrescido de fração polissacarídica da babosa (FPA) a 1,5; 3 e 4 mg/mL em relação ao controle (NA acrescido de HCl 0,05 N)..... 55
- Figura 16 - Perfil espectrofotométrico do extrato etanol-tolueno de plantas de tomate tratadas com fração polissacarídica da babosa (FPA, 3 mg/mL), Acibenzolar-S-metil e HCl 0,05 N (pH 5,6), inoculadas ou não com *X. gardneri* (Xg; 10^8 ufc/mL), aos 1 (A), 3 (B), 4 (C) e 6 (D) dias após os tratamentos. T0 = testemunha absoluta..... 57
- Figura 17 - Efeito de diferentes concentrações das quitosanas comercial, de baixo e médio peso molecular a 0,125; 0,250; 0,5 e 1 mg/mL sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani*. Linhas verticais no gráfico representam o desvio-padrão. Houve efeito de concentração das quitosanas sobre a germinação do fungo pelo teste F a 5%..... 67
- Figura 18 - Crescimento micelial de *Alternaria solani* em meio BDA acrescido de quitosanas com diferentes

- concentrações. Como as quitosanas apresentaram efeito similar sobre o crescimento micelial, escolheu-se apenas uma figura para ilustrar o padrão do crescimento, neste caso, meio BDA com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm)..... 68
- Figura 19 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), em diferentes concentrações, sobre a pinta preta. A inoculação foi feita com *Alternaria solani* (10^4 conídios/mL) 2 dias após a realização dos tratamentos. Não houve efeito de tratamentos ou de concentrações pelo ANOVA fatorial..... 70
- Figura 20 - Efeito da quitosana de baixo peso molecular (Qbpm), a 1,5 e 3 mg/mL, sobre a pinta preta, com inoculação de *Alternaria solani* (1×10^3 conídios/mL) feita 3 ou 5 dias após o tratamento. O HCl e ASM foram pulverizados 5 dias antes da inoculação com o fungo. Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste F a 5% de significância..... 71

LISTA DE SIGLAS

AS – Ácido salicílico
ASM – Acibenzolar-S-metil
BABA – Ácido β -aminobutírico
BSA – Albumina de soro bovino
CBB – Coomassie brilliant blue
BDA – Batata dextrose ágar
DO – Densidade óptica
EAG – Equivalente ácido gálico
EDTA – Etilenodiamino tetra-acético
EQ – Equivalente quercetina
FAL – Fenilalanina amônia-liase
FPA – Fração polissacarídica da *Aloe barbadensis*
HCl – Ácido clorídrico
IBGE – Insituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INA – Ácido dicloisonicotínico
IVCM – Índice de velocidade do crescimento micelial
MF – Massa fresca
PAHBAH – Hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila
NA – Nutriente ágar
PVP – Polivinilpirrolidona
Qbpm – Quitosana de baixo peso molecular
Qcom – Quitosana comercial
Qmpm – Quitosana de médio peso molecular
ufc – Unidades formadoras de colônias
Xg – *Xanthomonas gardneri*

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	2
CAPITULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PATOSSISTEMAS E CONSIDERAÇÕES SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA....	3
1.1 Cultura do tomateiro.....	3
1.2 Importantes manchas foliares do tomateiro.....	5
1.2.1 Mancha bacteriana.....	5
1.2.2 Pinta preta.....	7
1.3 Indução de resistência como alternativa para o controle de doenças..	8
1.3.1 Indução de resistência visando o controle de doenças em tomateiro.....	15
1.3.2 Quitosana: potencial no controle de doenças em plantas.....	16
1.3.3 Atividade biológica de componentes da <i>Aloe barbadensis</i> Miller.....	19
CAPITULO 2 – POTENCIAL DA QUITOSANA NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA EM PLANTAS DE TOMATE.....	21
2.1 Introdução.....	21
2.2 Material e Métodos	24
2.2.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	24
2.2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de <i>Xanthomonas</i> <i>gardneri</i>	24
2.2.3 Caracterização e modo de preparo das quitosanas utilizadas no estudo.....	25
2.2.4 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> sobre <i>Xanthomonas</i> <i>gardneri</i>	25
2.2.5 Aplicação dos tratamentos nas plantas, inoculação e avaliação da doença.....	26
2.2.6 Varredura espectrofotométrica de plantas de tomate tratadas com quitosana.....	26
2.2.7 Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides.....	27
2.2.8 Determinação da atividade de peroxidases e glucanases.....	28
2.2.9 Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL).....	29
2.2.10 Delineamento experimental das análises bioquímicas.....	29
2.2.11 Dosagem de proteínas totais.....	30
2.2.12 Análise estatística.....	30
2.3 Resultados.....	30
2.3.1 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> sobre <i>Xanthomonas</i> <i>gardneri</i>	30

2.3.2 Efeito da pulverização foliar da quitosana sobre a severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate.....	32
2.3.3 Perfil espectrofotométrico, quantificação de compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade da FAL.....	36
2.3.4 Atividade de peroxidases e glucanases em folhas de tomateiro tratadas com quitosana.....	41
2.4 Discussão.....	43
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DA BABOSA (<i>Aloe barbadensis</i> Miller) QUANTO AO EFEITO ANTIMICROBIANO E À PROTEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE CONTRA <i>Xanthomonas gardneri</i> ...	
3.1 Introdução.....	50
3.2 Material e métodos.....	51
3.2.1 Material vegetal e multiplicação dos patógenos.....	51
3.2.2 Obtenção da Fração Polissacarídica de <i>A. barbadensis</i> (FPA)..	52
3.2.3 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> da fração polissacarídica de <i>A. barbadensis</i>	52
3.2.4 Aplicação dos tratamentos nas plantas, inoculação e avaliação da doença.....	53
3.2.5 Varredura espectrofotométrica de plantas de tomate tratadas com FPA.....	53
3.2.6 Análise estatística.....	54
3.3 Resultados.....	54
3.3.1 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> sobre <i>Xanthomonas gardneri</i>	54
3.3.2 Efeito da pulverização foliar da FPA sobre a severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate.....	55
3.3.3 Perfil espectrofotométrico de plantas tratadas com FPA.....	56
3.4 Discussão.....	58
CAPÍTULO 4 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA E SEU EFEITO NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE CONTRA <i>Alternaria solani</i>	
4.1 Introdução.....	61
4.2 Material e métodos.....	62
4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	62
4.2.2 Obtenção, multiplicação e esporulação de <i>Alternaria solani</i> ...	63
4.2.3 Preparo das quitosanas utilizadas no estudo.....	63
4.2.4 Atividade antifúngica da quitosana <i>in vitro</i> sobre <i>Alternaria solani</i>	64
4.2.5 Aplicação dos tratamentos nas plantas, inoculação e avaliação da doença.....	65

4.2.6 Análise estatística.....	65
4.3 Resultados.....	66
4.3.1 Atividade antifúngica.....	66
4.3.2 Comportamento de plantas de tomate após aplicação de quitosana e desafio com <i>Alternaria solani</i>	69
4.4 Discussão.....	71
5 CONCLUSÕES.....	74
6 REFERÊNCIAS.....	75
7 APÊNDICES.....	92

APRESENTAÇÃO

Os entraves para o controle de doenças em plantas, assim como os danos ambientais causados pelo uso excessivo de defensivos agrícolas e seus efeitos nocivos à saúde humana, têm intensificado cada vez mais pesquisas na busca por alternativas para a proteção das culturas contra os efeitos deletérios de patógenos. A quitosana, polissacarídeo com multiplicidade de funções na indústria farmacêutica, médica e alimentar, tem demonstrado cada vez mais ser um importante componente na área agrícola para auxiliar no controle de doenças em plantas. Similarmente, plantas medicinais como a *Aloe barbadensis* apresentam riqueza de metabólitos com efeitos antimicrobianos e na proteção de plantas contra patógenos.

Este trabalho foi conduzido para explorar o potencial da quitosana no controle de duas importantes manchas foliares do tomateiro: a mancha bacteriana e a pinta preta. Adicionalmente, avaliou-se o efeito de uma fração polissacarídica obtida da *A. barbadensis* na proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana.

Dessa forma, o trabalho está organizado em quatro capítulos, compreendendo um capítulo teórico e três experimentais. O primeiro capítulo é uma explanação teórica de caracterização da cultura do tomateiro mostrando sua relevância econômica e social para o mundo e sua distribuição pelo Brasil. Posteriormente, é feita uma descrição das principais características das doenças abordadas no estudo e algumas considerações sobre indução de resistência.

Embora um dos critérios propostos por Steiner e Schonbeck (1995 citado por Romeiro, 2002) para confirmar a indução de resistência em plantas seja “ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante”, estudos têm demonstrado a capacidade da quitosana em ativar mecanismos de defesas das plantas e atuar diretamente sobre o patógeno. Nesse sentido, o segundo e terceiro capítulos compreendem uma avaliação do efeito *in vitro* da quitosana sobre *Xanthomonas gardneri* e *Alternaria solani*, e no controle das doenças causadas por tais patógenos, complementando-se com ensaios bioquímicos, quando pertinentes, que possibilitassem corroborar os dados de proteção mensurados pela severidade da doença. O quarto capítulo mostra o comportamento da *X. gardneri* crescida em meio contendo a fração polissacarídica da *A. barbadensis* e o efeito dessa fração na proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana.

OBJETIVOS

Geral

- Avaliar o efeito de quitosanas e da fração polissacarídica de babosa na proteção de plantas de tomate contra mancha bacteriana e pinta preta.

Específicos

- Avaliar o efeito de quitosana com diferentes pesos moleculares e de uma fração polissacarídica da babosa em plantas de tomates contra mancha bacteriana;
- Avaliar o efeito de quitosana com diferentes pesos moleculares, em plantas de tomates contra pinta preta;
- Analisar o efeito de diferentes concentrações e intervalos de aplicação dos compostos na redução da mancha bacteriana e da pinta preta;
- Determinar atividades de β -1,3-glucanases, peroxidases e fenilalanina amônia-liase;
- Verificar, por meio de varredura espectrofotométrica, classes de compostos que podem ser ativados pelo tratamento com quitosana e fração polissacarídica da babosa;
- Quantificar compostos fenólicos e flavonóides.
- Verificar o efeito de diferentes concentrações das quitosanas e da fração polissacarídica de babosa sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas gardneri* e *Alternaria solani*.

CAPITULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PATOSSISTEMAS E CONSIDERAÇÕES SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

1.1 Cultura do tomateiro

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) é uma planta perene, herbácea e apresenta tolerância a uma ampla variação de temperatura, mas as condições ideais para o cultivo são temperaturas em torno de 18 °C à noite, e em torno de 25 °C durante o dia (MAKISHIMA; CARRIJO, 1998). As plantas são autógamas, com flores hermafroditas, e a fecundação cruzada ocorre com frequência menor que 5%. Pertence à família Solanaceae a qual inclui, aproximadamente, outras 2.600 espécies com distribuição central na zona tropical da América, apresentando plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas (JARUATA; FANTOVA, 1999). É originário da América do Sul, porém sua domesticação ocorreu, primeiramente, por antigas civilizações do México. Foi introduzido na Europa na primeira metade do século XVI, depois se disseminou para as regiões da Ásia, África e Oriente Médio (NAIKA et al., 2006). No Brasil, foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX, mas sua propagação e aumento no consumo ocorreram depois da Primeira Guerra Mundial (ALVARENGA, 2004).

Durante muitos anos, o tomateiro foi considerada uma espécie venenosa e seu cultivo era somente como planta ornamental (SILVA; GIORDANO, 2000). A toxicidade de algumas solanáceas é devido à presença de alcalóides tais como a tomatina. No tomate, embora estes compostos estejam presentes em altas concentrações nas folhas e frutos verdes, transformam-se em compostos inertes em frutos maduros (ALVARENGA, 2004).

A cultura do tomateiro assume grande importância econômica, sendo o tomate um dos produtos hortícolas mais comercializados no mundo (ORDÓÑEZ-SANTOS et al., 2009). Em 2007, a produção mundial foi superior a 126 milhões de toneladas e a brasileira atingiu mais de 3,4 milhões de toneladas (Tabela 1), colocando o Brasil como 9º maior produtor de tomate do mundo (FAO, 2007). É a hortalíça de maior comercialização no país, muito apreciada pelo seu elevado valor nutritivo (PENTEADO, 2004). O principal centro produtor é a região Sudeste, com o estado de São Paulo responsável por 12.466 ha da área plantada e 763.227 t da produção. Em segundo lugar está a região Centro-Oeste, tendo o estado de Goiás 9.820 ha da área plantada e produção de 801.960 t. Na região Nordeste, Sul e Norte, os principais

produtores de tomate são os estados da Bahia (5.312 ha e 211.727 t), Paraná (4.719 ha e 310.338 t) e Pará (598 ha e 16.757 t), respectivamente. A maior parte da produção do tomate é destinada ao consumo *in natura*, mas algumas regiões destinam-na ao processamento industrial (IBGE, 2007).

Tabela 1 - Área cultivada (hectares) e produção (toneladas) de tomate para as regiões do Brasil no ano de 2007.

REGIÃO	ÁREA (ha)	PRODUÇÃO (t)
Sudeste	23.705	1.403.973
Centro-Oeste	10.507	837.860
Nordeste	12.872	514.978
Sul	9.437	552.083
Norte	2.054	32.338

Adaptado do IBGE, 2007

ha = hectare; t = tonelada.

Cumpra salientar que as atividades que vão desde o cultivo ao processamento do tomate são responsáveis por uma grande geração de mão-de-obra e, portanto, desempenham função social com a obtenção de economia e renda para o país.

Um dos fatores que têm contribuído para a elevação no consumo de tomate é a consolidação de redes *Fast food* que favorecem o consumo do fruto tanto nas formas processadas ou frescas. Aliado a esse fator, o fruto fresco apresenta baixo teor calórico, é rico em vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais, os quais contribuem para uma dieta saudável e equilibrada (NAIKA et al., 2006) e é fonte primária de compostos antioxidantes como ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos (GIOVANELLI; PARADISO, 2002). O tomate apresenta grandes quantidades do carotenóide licopeno, substância que protege membranas celulares contra lesões causadas por radicais livres, desempenhando papel essencial na proteção de doenças (SHAMI; MOREIRA, 2004; GAHLER ; OTTO; BOHM, 2003)

Contudo, o tomateiro é acometido por diversas doenças que podem restringir a sua produtividade, a depender do nível de resistência genética que a cultivar apresenta.

1.2 Importantes manchas foliares do tomateiro

A mancha bacteriana, causada por espécies de *Xanthomonas*, constitui uma das principais doenças bacterianas foliares do tomateiro. Os prejuízos causados por tais bactérias são mais intensos em períodos chuvosos e quentes, pois a água livre favorece a disseminação do patógeno, assim como a infecção e a colonização das plantas. Nessas condições, as perdas podem atingir 100% (QUEZADO-DUVAL et al., 2007). Outra importante doença foliar da cultura é a pinta preta ou mancha de alternaria, causada por *Alternaria solani*. Também há uma preocupação maior nos períodos quentes e úmidos, os quais favorecem a disseminação do patógeno (PAUL et al., 2004).

1.2.1 Mancha bacteriana

A mancha bacteriana apresenta etiologia bastante complexa. Foi primeiramente observada no sul da África e descrita por Ethel M. Doidge em 1920 como cancro bacteriano, com o agente causal denominado *Bacterium vesicatorium*. Um ano depois, a doença foi descrita nos Estados Unidos por Gardner e Kendrick, com a designação mancha bacteriana, como é conhecida atualmente, tendo como suposto agente causal *B. exitiosum*. Gardner e Kendrick observaram que havia diferenças entre as bactérias descritas nos dois países, pois aquela identificada por eles era fortemente amilolítica, enquanto a descrita por Doidge degradava fracamente o amido ou era não amilolítica. Como naquela época havia poucas técnicas para uma diferenciação mais apurada, ambos os patógenos foram classificados como *X. vesicatoria* e posteriormente foram denominados *X. campestris* pv. *vesicatoria* por Dye em 1978 (YOUNG, 2001).

Em 1990, Vauterim et al. e Stall et al. analisaram os padrões de proteínas, por SDS-PAGE, de várias linhagens de xanthomonas e determinaram que as duas espécies são de fato distintas genética e fenotipicamente, propondo então uma reclassificação com a separação de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Grupo A) e *X. vesicatoria* (Grupo B). Além das duas bactérias descritas, *X. perforans* e *X. gardneri* foram isoladas de tomate. A bactéria *X. gardneri* (Grupo D) foi primeiramente isolada na Iugoslávia por Sutic em 1957 com o nome de *Pseudomonas gardneri* e inicialmente considerada sinônima de *X. vesicatoria*, entretanto, estudos realizados comprovaram que se trata de uma entidade distinta (JONES et al., 2004).

Apesar da posição taxonômica de *X. gardneri* ainda não estar muito clara e até recentemente ser tratada como uma espécie de ocorrência esporádica restrita à Iugoslávia e Costa Rica (JONES, 2000), estudos recentes têm contribuído com relação à distribuição dessa espécie no mundo. Uma pesquisa realizada no Brasil para verificar a composição da população de xanthomonas associadas à mancha bacteriana no tomateiro revelou que tanto *X. gardneri* como *X. perforans*, aparentemente, são as espécies mais importantes numa das principais regiões produtoras do país, a região Centro-Oeste (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2005; QUEZADO-DUVAL, 2004). Em Ontário, Canadá, observou-se que *X. gardneri* está se tornando prevalente (WARNER, 2003). Quanto a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*, essas apresentam uma distribuição mundial (JONES, 2000). Outros estudos têm se dedicado à biologia de *X. gardneri* e a sua interação com a planta (CÂNDIDO et al., 2008; SCHORNACK et al., 2008), entretanto estes ainda são poucos. Essas diferentes espécies podem acometer pimentão (WIERZBICKI, 2004).

Xanthomonas spp. é gram-negativa, aeróbia, em forma de bastonete e mede 0.7-1.0 x 2.0-2.4 μm . Apresenta movimento favorecido por um único flagelo polar e, em meio de cultura, as colônias são circulares, viscosas, brilhantes e de coloração amarela, proporcionada pelo pigmento xanthomonadina (ALVARENGA, 2004; JONES et al., 1991). Este pigmento está relacionado à regulação de processos fisiológicos da bactéria, como produção de polissacarídeo extracelular e tem sido pesquisada sua relação com a patogenicidade.

A bactéria se dissemina através do solo, sementes, respingos de água e restos de vegetais contaminados, podendo infectar as plantas por meio dos estômatos e ferimentos causados por equipamentos (LOPES; AVILA, 2005).

A doença pode afetar toda a parte aérea da planta, entretanto, a infecção nas folhas e a conseqüente desfolha são problemas mais sérios, sendo responsáveis pela redução na produção e na qualidade dos frutos (SILVA-LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005). As condições propícias para o surgimento de epidemias da doença são temperaturas entre 20 °C e 30 °C e alta umidade relativa do ar. As manchas nas folhas aparecem com coloração castanha, aspecto encharcado, e formato circular, podendo coalescer. Estabelecida a doença, as folhas tornam-se amareladas, caem e os frutos podem se queimar por exposição ao sol (NAIKA et al., 2006). No pecíolo e caule, podem ser visualizadas lesões alongadas, de cor marrom, e nas partes florais o ataque pode provocar

queda de flores. Frutos atacados apresentam manchas marrons, tornando-se corticosos e com bordas elevadas (LOPES; SANTOS, 1994).

Além das perdas diretas causadas pela mancha bacteriana, tem-se o gasto com produtos químicos, como fungicidas à base de cobre e antibióticos agrícolas, utilizados para o controle da doença (DUVAL, 2003). No entanto, este controle, além de aumentar o custo de produção, tem sido de baixa eficiência, podendo até causar prejuízos no desenvolvimento das plantas e de frutos se forem realizadas aplicações freqüentes, mesmo em doses recomendadas. Aliado a esse fato, os defensivos podem causar danos ao ambiente e, conseqüentemente ao homem, uma vez que podem contaminar solos, água e até mesmo os alimentos (SILVA; FAY, 2006). Portanto, o controle é efetivo quando se utiliza um conjunto de medidas de caráter preventivo (tratamento de sementes, uso de variedades com algum nível de resistência) (KUROZAWA; PAVAN, 2005), e nos últimos anos, os pesquisadores vêm buscando medidas alternativas aos fungicidas para o manejo da bacteriose.

1.2.2 Pinta preta

Dentre os fungos que atacam a cultura do tomateiro, *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout, responsável pela pinta preta, afeta diversos órgãos da planta como folhas, hastes e frutos. Pertence à família Dematiaceae (Filo Deuteromycota) e apresenta micélio septado, o qual pode tornar-se escuro com a idade. Os conídios têm 12-20 x 120-296 µm e apresentam um apêndice na extremidade. Cresce radialmente em meio de cultura produzindo pigmentos amarelados os quais se difundem pelo substrato. O fungo penetra na planta diretamente através da cutícula ou por ferimentos (JONES et al., 1991). Pode ser transmitido pelo vento, respingos de chuva, água de irrigação, insetos e por sementes contaminadas, nesse caso, causando tombamento na pré e pós-emergência (ALVARENGA, 2004; SILVA; GIORDANO, 2000).

A pinta preta é considerada uma das mais importantes doenças no Brasil, provocando grandes prejuízos econômicos (BALBI-PEÑA et al., 2006). Ocorre em praticamente todas as regiões em que o tomateiro é cultivado, provocando perdas pela infecção dos frutos e por reduzir o vigor da planta decorrente da desfolha. Condições como alta umidade e temperaturas entre 25 °C e 30 °C são propícias para maior severidade e conseqüente redução na produtividade da planta. Outro fator que eleva a suscetibilidade ao patógeno são os tecidos maduros, sendo que na fase

de frutificação há maior incidência da doença (TÖFOLI; DOMINGUES, 2005). As lesões podem surgir 2 ou 3 dias após a inoculação com *A. solani*, sendo a infecção favorecida pela presença de água livre nas folhas (ALVARENGA, 2004).

Os sintomas podem estar localizados nas folhas, frutos e caule. A doença é caracterizada por pontuações pardo-escuras e necróticas, que ocorrem primeiramente em folhas baixas (mais velhas) e, com a evolução da doença, as manchas aumentam formando anéis concêntricos que podem atingir 1,5 cm de diâmetro, coalescem e causam desfolha da planta, expondo os frutos à queima pelo sol (NAIKA et al., 2006; PENTEADO, 2004). Normalmente não são observados ataques em folhas novas, o que diferencia a pinta preta de outras doenças como a mancha bacteriana. Nos frutos, ocorre o desenvolvimento de podridões escuras a partir do pedúnculo, e no caule aparecem manchas arredondadas, muitas vezes com anéis concêntricos (LOPES; SANTOS, 1994). O fungo sobrevive no solo, em folhas e caules infectados, em restos culturais ou em hospedeiras alternativas. A produção de clamidósporos pode permitir a sobrevivência de *A. solani* no período de entressafra (PATTERSON, 1991).

O controle dessa doença é baseado, principalmente, em aplicações sistemáticas de fungicidas, porém não têm sido efetivos (PAUL et al., 2004). Também não se conhecem cultivares comerciais com alto nível de resistência à pinta preta. Outro problema prático é o fato da doença ocorrer, principalmente, no período de frutificação, o que inviabiliza a aplicação destes produtos químicos, que são nocivos à saúde humana (RAO et al., 2008).

1.3 Indução de resistência como alternativa para o controle de doenças

Muita atenção tem sido destinada para a utilização da resistência genética visando reduzir as perdas causadas por doenças (CHAERANI; VOORRIPS, 2006). Entretanto, os resultados dessa prática demandam longos prazos e, além disso, muitos patógenos apresentam grande diversidade, o que dificulta uma resistência duradoura.

Uma das medidas promissoras para o controle de doenças em plantas é a indução de resistência (IR). Em plantas suscetíveis, a resistência pode ser ativada por meio de eliciadores bióticos ou abióticos, aplicados preventivamente sobre as plantas, resultando na expressão de mecanismos de defesa latentes (HAMMERSCHMIDT,

1999) sem qualquer alteração no genoma da planta (STADNIK; MARASCHIN, 2004). Neste sentido, a IR pode levar uma relação compatível entre planta e patógeno a uma relação incompatível (LABANCA, 2002).

A IR tem sido empregada contra uma gama de patógenos como vírus, bactérias e fungos, resultando na estagnação ou redução dos sintomas característicos da doença (CURSINO-SANTOS; DEFINA; MARTINEZ-ROSSI, 2003). Geralmente, ocorre uma redução no tamanho e/ou número de lesões desenvolvidas após a inoculação de plantas pré-elicidadas com um agente indutor (HAMMERSCHMIDT, 1999).

As respostas do hospedeiro numa relação incompatível podem culminar com a formação de barreiras estruturais como lignificação e síntese de calose, inibindo a proliferação do patógeno nos tecidos das plantas (EL GHAOUTH; AHMAD, 1994; KUC, 2001), além de respostas bioquímicas como compostos fenólicos e várias proteínas de defesa (BAYSAL et al., 2003; BRISSET et al., 2000; CAVALCANTI et al., 2006a; RODRIGUES et al., 2006). As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) respondem pelas maiores mudanças quantitativas nas proteínas solúveis durante as respostas de defesa (STINTZI et al., 1993).

Proteínas-RP foram primeiramente detectadas em fumo (*Nicotiana Tabacum* var. Samsun NN) que exibiram reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico (TMV) (VAN LOON; VAN KAMMEN, 1970) sendo definidas como proteínas codificadas por plantas, mas induzidas somente na patogênese ou em condições relacionadas, podendo se acumular tanto local como sistemicamente (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Essa descoberta possibilitou que diferentes proteínas-RP de outras espécies envolvendo mono e dicotiledôneas pudessem ser caracterizadas. Até 2006, 17 famílias dessas proteínas foram reconhecidas e caracterizadas, algumas com funções desconhecidas (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). As proteínas-RP apresentam propriedades físico-químicas típicas, as quais permitem distingui-las das demais proteínas: são estáveis em pH ácido e altas temperaturas, e resistentes à ação de enzimas proteolíticas, características estas que possibilitam sua existência nos locais onde ocorrem: vacúolo, parede celular ou espaços intercelulares (STINTZI et al., 1993).

Dentre as proteínas-RP, as β -1-3 glucanases exercem um importante papel no mecanismo de defesa. Pertencente à família RP-2, apresentam massa molecular entre 25 e 35 KDa, com formas ácidas e

básicas. São hidrolases que atuam sobre a β -glucana presente na parede celular de muitos fitopatógenos, promovendo a desorganização da mesma (BOL; LINTHORST, 1990). Campos et al. (2009) observaram que quando plantas de feijão-comum foram induzidas com uma raça avirulenta de *Colletotrichum lendemithianum* e inoculadas com raça virulenta, houve acréscimo na atividade dessa enzima, estando essa altamente correlacionada com a redução da severidade da antracnose. O tratamento de sementes de soja com *Bacillus bamyloliquefaciens* levou a um aumento da atividade de β -1-3 glucanases em plantas, além de conferir proteção contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (BUENSANTEAI; YUEN, 2009). Em fumo, o nível de expressão do mRNA da β -1-3 glucanases foi 11 vezes maior 8 h após o tratamento de plantas com oligoquitosana (obtida por hidrólise enzimática da quitosana), comparadas ao controle, evidenciando a associação dessa enzima na defesa da planta contra o TMV. A porcentagem de inibição das lesões virais foi de 31,16%, considerada significativa em relação ao controle (YAFEI et al., 2009). A atividade de β -1,3-glucanases em plantas de tomate foi aumentada significativamente pelo tratamento prévio com extratos aquosos de *A. blazei* ou ASM, com o pico da atividade aos 3 e 6 dias após os tratamentos, respectivamente, ocorrendo um leve aumento na atividade após a inoculação com *X. vesicatoria* (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004). Cohen et al. (1994) também relatam que a indução de resistência em folhas de tomate tratadas com ácido β -aminobutírico contra *Phytophthora infestans* coincide com o acúmulo de glucanases.

As peroxidases também estão relacionadas com mecanismos de defesa das plantas. São glicoproteínas (RP-9) com 40 KDa de massa molecular associadas à membrana que estão diretamente envolvidas, dentre outros processos, na deposição de lignina na parede celular das plantas para impedir a proliferação e o desenvolvimento de patógenos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Tais enzimas oxidam fenóis a quinonas tóxicas ao patógeno, com a produção de peróxido de hidrogênio, o qual lhe serve como substrato (MANDAL; MITRA; MALLICK, 2009). O tratamento de sementes de milho com extrato aquoso de *Datura metel*, e inoculação com *Sclerospora graminicola*, promoveu um aumento da atividade de peroxidases nas plântulas (43,7 unidades), comparando com a testemunha inoculada (33 unidades). Além disso, o extrato resultou em 92% da germinação de semente contra 85% do controle e aumentou o índice de vigor. Dessa forma, o tratamento de sementes com extrato de *D. metel* promoveu aumento da

resistência contra míldio, com uma proteção de até 79% em casa de vegetação e 69% sob condições de campo (DEVAIAH; MAHADEVAPPA; SHETTY, 2009). A indução de resistência de tomate com aplicação exógena de ácido salicílico contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* esteve associada a uma ativação da atividade de peroxidase que foi 4,7 e 3,3 vezes maior em plantas tratadas com ácido salicílico nas raízes e aplicação foliar, respectivamente, comparadas ao controle. O composto reduziu significativamente o escurecimento vascular e o amarelecimento foliar causados pelo patógeno (MANDAL; MITRA; MALLICK, 2009).

A fenilalanina amônia liase (FAL) é uma das enzimas-chave na rota dos fenilpropanóides. É responsável pela desaminação da L-fenilalanina com conseqüente formação do ácido *trans*-cinâmico, o qual é incorporado em diferentes compostos fenólicos envolvidos na formação de flavonóides e lignina, por exemplo (TAIZ; ZEIGER, 2009). A lignificação é essencial para a integridade estrutural da parede celular das plantas e constituiu em um dos seus mecanismos de defesa (BHUIYAN, et al., 2009). A resistência de muitas plantas a patógenos está relacionada ao rápido acúmulo de lignina no sítio de infecção, inibindo a penetração do patógeno (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982). Quanto aos flavonóides, aqueles envolvidos com a defesa de plantas podem atuar tanto como sinalizadores, como apresentar atuação direta sobre o patógeno. Dessa forma, podem inibir a atividade de celulases, pectinases e xilanases dos patógenos, e formar uma barreira física, impedindo o ataque patogênico (SKADHAUGE; THOMSEN; WETTSTEIN, 1997).

Latha et al. (2009) investigaram o efeito de extrato de alho e bioformulações de rizobactérias promotoras do crescimento na indução de resistência de plantas de tomate contra *Alternaria solani*, e observaram um aumento na atividade da FAL, com um acúmulo máximo 5 dias após o tratamento envolvendo uma mistura dos produtos (extrato de alho + *Pseudomonas fluorescens* + *Bacillus subtilis*). Houve uma redução na incidência da doença, sendo o efeito da mistura comparável ao fungicida Mancozeb. Aplicação de silício em plantas de arroz e posterior inoculação com *Magnaporthe grisea* promoveu incremento na atividade da FAL em relação a plantas somente tratadas e, além disso, o silício reduziu a incidência da doença em 42% e 83% na cultivar suscetível e resistente, respectivamente (CAI et al., 2008). Em plantas de tomate, o tratamento com ozônio para induzir resistência contra *Cucumber mosaic virus*, promoveu aumento na atividade da FAL

após a inoculação com o vírus, além de reduzir a incidência da doença em até 62 % (SUDHAKAR et al., 2007).

Heil (2001) aponta que a grande maioria dos trabalhos sobre indução de resistência tem se concentrado nas proteínas-RP, mas é de suma importância considerar a atuação de outros compostos que estão diretamente envolvidos na defesa das plantas, tais como, compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem em sua estrutura um anel aromático com pelo menos uma hidroxila e podem ser produzidos via ácido chiquímico a partir da fenilalanina. Alguns fenóis são produzidos constitutivamente nas plantas, outros são formados em resposta ao ataque patogênico e atuam como substâncias tóxicas, além de estarem envolvidos na lignificação da parede celular da plantas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 2002; VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). O tratamento de plantas de trigo com quitosana promoveu aumento de compostos fenólicos, o que inibiu a proliferação do *Fusarium graminearum* nas raízes da planta (BHASKARA REDDY et al., 1999). Kandan et al. (2002) mostraram que linhagens de *Pseudomonas fluorescens* promoveram acúmulo de compostos fenólicos e lignina em plantas de tomate, além de reduzir a virose causada pelo *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).

Os flavonóides ocorrem em abundância nas plantas e constituem um grande grupo de metabólitos secundários, incluindo antocianinas, flavonas, chalconas, dentre outros. Esses polifenóis de baixo peso molecular geralmente são armazenados em locais estratégicos, onde possam atuar na defesa das plantas (TREUTTER, 2006; BOVY; SCHIJLEN; HALL, 2007). Em plantas de algodão, a produção de antocianinas é um indicador da resistência à mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (KANGATHARALINGAM et al., 2002). Em citros e oliveira, o Brotomax (suplemento nutricional de plantas) estimulou a biossíntese e acúmulo de flavonóides, com aumento da resistência contra *Phytophthora citrophthora* (DEL RÍO et al., 2000, 2003). De maneira similar, Arcas et al. (2000) verificaram que o aumento no conteúdo de flavonóides em frutos cítricos, após radiação com UV, esteve associado à inibição da proliferação do *Penicillium digitatum*. Em plantas de arroz, a quitosana estimulou a produção de compostos antifúngicos, como o flavonóide sacuranetina e fitoalexinas (AGRAWAL et al., 2002).

Para que sejam desencadeados esses mecanismos, é importante um sistema eficiente de reconhecimento do patógeno pela planta. Este sistema envolve genes de resistência da planta (R) e de avirulência do

patógeno (avr), ou a interação de eliciadores não específicos (produtos de patógenos, fatores abióticos, dentre outros) com possíveis receptores da planta, normalmente proteínas da membrana plasmática. A partir de então, uma série de eventos resultará na ativação de genes de resistência, síntese de proteínas-PR e de outros compostos tóxicos ao patógeno, além daqueles capazes de alterar estruturalmente as células e impedir o avanço do patógeno. O uso de indutores de resistência permite que a planta fique em um estado de “pré-condicionamento” (*Priming*) (Figura 1). Nesse caso, somente após o contato com o patógeno ocorrerá um aumento da capacidade para uma rápida e efetiva ativação dos seus mecanismos de defesa, os quais envolvem as proteínas-PR, explosão oxidativa, lignificação da parede celular, secreção de fitoalexinas, dentre outros (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002).

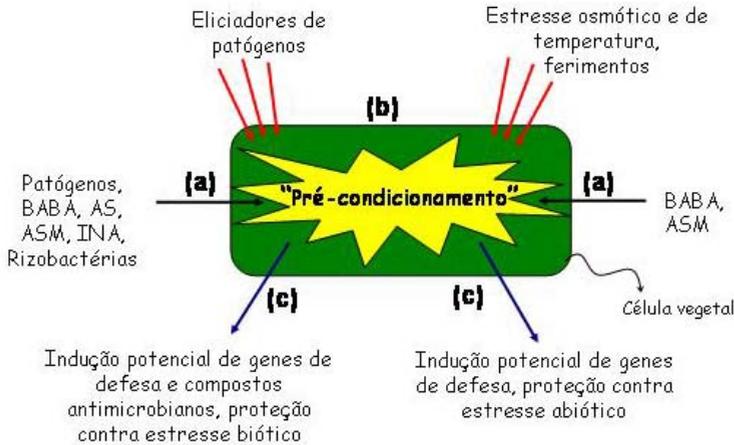


Figura 1 - Esquema do pré-condicionamento (adaptado de CONRATH et al., 2002). O tratamento com ácido salicílico (AS), ácido β -aminobutírico (BABA), ácido dicloisonicotínico (INA) ou acibenzolar-S-metil (ASM) pré-condiciona as células vegetais a reagirem mais rápida e eficientemente a um ataque subsequente de patógenos ou estresse abiótico. (a) Etapas do pré-condicionamento, (b) estresse biótico ou abiótico, (c) resposta de defesa potencializada.

Segundo Labanca (2002), o potencial dos indutores de resistência além de chamar a atenção da comunidade acadêmica, representa um interesse para a área comercial, pois pelo menos cinco destes produtos já estão registrados no mundo (Oryzmate[®], Bion[®], Messenger[®], Oxycon[®] e Elexa[®], os quais apresentam, respectivamente, probenazole, acibenzolar-S-metil, proteína harpina, combinação de fertilizantes+ácido peracético+ácido acético+peróxido de hidrogênio, e quitosana como ingredientes ativos. Além destes, outros compostos vêm sendo pesquisados como potenciais eliciadores de respostas de defesa das plantas. Dentre eles, extrato de plantas medicinais (FRANZENER et al., 2007), óleos essenciais (DINIZ et al., 2006), extrato de cogumelos (DI PIERO, 2003), rizobactérias promotora de crescimento de plantas (CHEN et al., 2000), além de produtos químicos como os ácidos β -aminobutírico (GURGEL et al., 2005) e silício (ZANÃO JUNIOR; FONTES; ÁVILA, 2009).

1.3.1 Indução de resistência visando o controle de doenças em tomateiro

O cultivo de tomateiro em sistema convencional no Brasil requer a utilização de grandes quantidades de agrotóxicos e no sistema orgânico poucos desses insumos são permitidos no manejo de doenças (DINIZ et al., 2006). Considerando estes aspectos, é importante que medidas alternativas sejam implementadas, a fim de controlar doenças na cultura. A indução de resistência é uma alternativa ao manejo de doenças que pode reduzir os impactos ambientais causados pelo uso excessivo de produtos tóxicos.

No tomateiro, alguns produtos têm sido utilizados contra diversos patógenos, dentre eles o acibenzolar-S-metil (ASM), um composto químico sintético que apresenta estrutura similar ao ácido salicílico (SOBRINHO; CAVALCANTI; FERREIRA, 2005). O ASM é translocado ao longo da planta, e é provável que ative uma cascata de sinalização que culmina com a ativação de respostas de defesa (FRIEDRICH et al., 1996). Atualmente, está disponível comercialmente no Brasil com o nome Bion[®], e é registrado para a cultura do tomate no controle de doenças fúngicas e bacterianas (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda).

Vários trabalhos identificaram o ASM como um potente indutor de resistência. Plantas de tomate tratadas com o indutor apresentaram redução significativa na severidade do cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (KRONKA, 2004). Por sua vez, a proteção contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) do tomateiro, promovida pelo Ecolife, foi evidenciada no trabalho realizado por Cavalcanti et al. (2006b), com aumento da atividade de peroxidases e polifenolxidasas. O mesmo indutor protegeu tomateiros contra *Cucumber mosaic virus* (ANFOKA, 2000). Os relatos se entendem para doenças fúngicas. Houve uma redução significativa da severidade da pinta preta em folíolos de tomate tratados com ASM (TÖFOLI; DOMINGUES, 2005).

Extratos de origem fúngica e vegetal também têm sido testados. Cavalcanti e colaboradores (2007a) observaram que a suspensão aquosa do micélio de *Crinipellis pernicioso*, contendo quitosana, induziu a resistência de plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria*, aumentando a atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e quitinase, e a deposição de lignina. O extrato aquoso obtido de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectada com *Crinipellis pernicioso* [(Stahel) Singer] conferiu proteção a plantas de tomate contra a *X. axonopodis* pv.

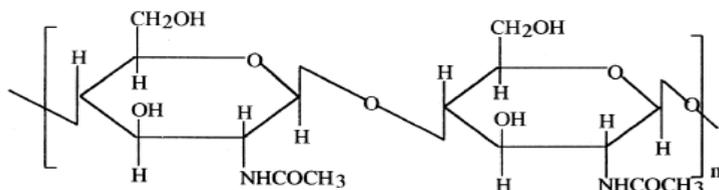
vesicatoria, enquanto que o extrato obtido de ramos de lobeira sadios, não promoveu redução significativa da doença (CAVALCANTI et al., 2007b). A cúrcuma e a curcumina foram testados em plantas de tomate e apresentaram potencial na redução dos sintomas causados por *A. solani* (BALBI-PENÑA et al., 2006). O óleo de nim (*Azadirachta indica* L.) mostrou ser promissor para o controle da requeima do tomateiro causada por *Phytophthora infestans* (DINIZ et al., 2006).

Além dos produtos citados, a quitosana vem sendo amplamente pesquisada na interação planta-patógeno. Diferentes estudos procuram elucidar o mecanismo de ação do polissacarídeo tanto na indução de respostas de defesa do hospedeiro como na atuação antimicrobiana direta (FAORO et al., 2008; EL GHAOUTH, 1992; BEN-SHALOM et al., 2003).

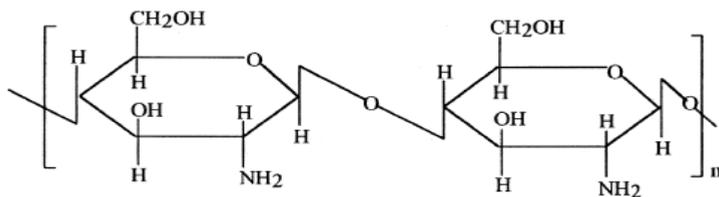
1.3.2 Quitosana: potencial no controle de doenças em plantas

A quitosana é formada pela desacetilação alcalina da quitina, a qual pode ser extraída do exoesqueleto de crustáceos ou obtida a partir da parede celular de alguns fungos. É um polissacarídeo linear, constituído por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose (glucosamina) e 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosose (acetilglucosamina) unidas por ligações glicosídicas β 1→4 (Figura 2) (WANG et al., 2008; BADAWEY; RABEA et al., 2009; MAJETI; KUMAR, 2000).

A quitina e a quitosana podem ser diferenciadas pelo grau de desacetilação e solubilidade, sendo que a primeira apresenta, predominantemente, unidades de acetilglucosamina e é insolúvel na maioria dos solventes testados; a quitosana é constituída por frações de acetilglucosamina e glucosamina cujas proporções relativas têm grande efeito na sua solubilidade que ocorre em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos (acético, fórmico, cítrico) e inorgânicos como ácido clorídrico (AZEVEDO et al., 2007; SANTOS et al., 2003). Segundo Goy, Assis e Campanha-Filho (2004), o termo quitosana é utilizado para identificar 60% de unidades desacetiladas, já a quitina se constitui num produto mais acetilado.



Quitina



Quitosana

Figura 2 - Estrutura da quitina e quitosana (adaptado de MAJETI e KUMAR, 2000)

Evidências experimentais têm demonstrado a capacidade da quitosana de modificar o metabolismo de defesa vegetal em diversas culturas. O efeito protetor de plantas é comprovado pela indução de marcadores bioquímicos como proteínas-RP, fitoalexinas, inibidores de proteases, além de compostos estruturais como lignina e calose (BENHAMOU et al., 1996; EL GHAOUTH, AHMAD, 1994; HADWIGER; BECKMAN, 1980). O polissacarídeo apresenta, portanto, efeito duplo, pois além de ativar vários mecanismos de defesa nos tecidos das plantas, pode atuar diretamente sobre patógenos.

O que tem sido sugerido para a atuação antimicrobiana da quitosana é que suas cargas policatiónicas interagem com resíduos de carga negativa das macromoléculas expostas na superfície da célula de patógenos, causando alteração na permeabilidade da membrana celular com extravasamento de constituintes intracelulares (BENHAMOU, 1996). Os relatos mostram um efeito tanto da concentração como do peso molecular e grau de desacetilação da quitosana na atividade antimicrobiana do polissacarídeo.

Ben-Shalom et al. (2003), em estudo realizado com *Botrytis cinerea*, mostraram que concentrações relativamente baixas da quitosana (0,020 - 0,030 mg/mL) inibiriam 50% da germinação de conídios e, com

0,050 mg/mL, houve quase uma inibição total da germinação. Para *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* do feijão e *Fusarium solani* f. sp. *pisi* da ervilha, a inibição da germinação e do crescimento micelial ocorreu a 0,031 e 0,062 mg/mL, respectivamente (HADWIGER; BECKMAN, 1980). Já para *Phytophthora parasitica* do tabaco, foram necessárias concentrações maiores (0,25 - 1,0 mg/mL), comparadas aos trabalhos supracitados, as quais inibiram significativamente o crescimento de três linhagens do patógeno (FALCÓN et al., 2008).

O efeito antifúngico da quitosana contra o *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* do morango foi observado com concentrações entre 0,75 e 6,0 mg/mL (EL GHAOUTH et al., 1992), sendo observadas alterações morfológicas nas hifas de *R. stolonifer* as quais apresentaram excessivas ramificações em concentrações acima de 1,5 mg/mL. Fungos do tomate, *B. cinerea* e *Penicillium expansum*, foram fortemente inibidos pela quitosana (0,1 - 1,0 mg/mL) (LIU et al., 2007). A germinação de esporos de *B. cinerea*, *P. expansum*, *p. digitatum* da maçã, laranja e limão, também foi inibida pela quitosana (0,025 - 0,5 mg/mL) (EL GHAOUTH; SMILANICK; WILSON, 2000).

Badawy e Rabea (2008) testaram quitosanas com diferentes pesos moleculares a 0,25 e 0,5 mg/mL sobre o crescimento micelial de *B. cinerea* do tomate e observaram que quanto menor o peso molecular da quitosana, maior a atividade antifúngica. Outro estudo recente corrobora os resultados obtidos pelos autores. No caso, Hernández-Lauzardo et al.(2008), avaliando o efeito de concentrações (1,0; 1,2 e 2,0 mg/mL) e pesos moleculares de quitosana sobre *R. stolonifer* do tomate, encontraram que a de baixo peso molecular foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial, enquanto a de alto peso molecular reduziu a esporulação, germinação e alterou a morfologia dos conídios. Por sua vez, Chien, Sheu e Lin (2007) demonstraram que uma quitosana de baixo peso molecular apresentou uma atividade antifúngica mais elevada que o fungicida Thiabendazole contra *P. digitatum*, *P.italicum*, *Botrydipodia lecanidion* e *B. cinerea* da tangerina. Contrariamente a estes resultados, Guo et al. (2006), observaram que a inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Alternaria solani* e *Valsa mali* ocorreu quando estes cresceram em meio contendo quitosana de alto peso molecular (0,005; 0,05 e 0,5 mg/mL).

Nota-se que são diversos trabalhos do efeito fungicida da quitosana, entretanto, a atividade contra bactérias causadoras de doenças em plantas tem sido pouco estudada. Há relatos da atividade bactericida da quitosana em bactérias causadoras de doenças em humanos. Oligossacarídeos de quitosana mostraram elevada atividade bactericida contra *Escherichia coli* (JEON; PARK; KIM, 2001). Jae-Young e Se-

Kwon (2006) demonstraram que um derivado de quitosana provocou a destruição da membrana celular tanto em *E. coli* como em *S. aureus*, com extravasamento de DNA, RNA, dentre outras moléculas. Em termos agrícolas, Li et al. (2008) demonstraram o potencial da quitosana sobre *X. arboricola* pv. *poinsettiicola* e *X. axonopodis* pv. *poinsettiicola* e, segundo os autores, esse foi o primeiro relato do efeito *in vitro* da quitosana sobre bactérias fitopatogênicas. Em 2009, Rabea et al. mostraram a atividade antibacteriana da quitosana contra *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia carotovora*.

No que tange à atuação da quitosana sobre o controle de doenças de plantas, Rodrigues, Bezerra-Neto e Coelho (2006) verificaram que plantas de feijão caupi submetidas ao tratamento indutivo com a quitosana apresentaram uma redução na severidade da murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* diferindo significativamente de plantas controle. Para a antracnose do feijoeiro-comum, causada pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, o polissacarídeo reduziu a severidade da doença e promoveu aumento da atividade de β -1,3-glucanases (DI PIERO; GARDA, 2008). Em pepino, houve inibição no desenvolvimento do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*, pelo tratamento prévio com quitosana (BEN-SHALOM et al., 2003) e em mamão e uva, redução da antracnose (CIA, 2005) e mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) (ROMANAZZI et al., 2002), respectivamente.

O uso combinado da quitosana com a rizobactéria *Bacillus pumilus* induziu resistência em plantas de tomate contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, com aumento de fitoalexinas e compostos fenólicos e estruturais (BENHAMOU; KLOEPPER; TUZUN, 1998; BENHAMOU; THÉRIAULT, 1992). Em frutos de tomate, a quitosana reduziu significativamente doenças causadas por *B. cinerea* e *P. expansum*, aumentando a atividade de peroxidases e de polifenoloxidases (LIU et al., 2007).

1.3.3 Atividade biológica de componentes da *Aloe barbadensis* Miller

As plantas medicinais exibem propriedades antimicrobianas e podem atuar como eliciadores na indução de mecanismos de defesa das plantas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Como exemplo, citam-se os hidrolatos obtidos de *Helietta apiculata* (canela-de-veado) e *Conyza canadensis* (buva), os quais mostraram uma atividade tanto antibacteriana como antifúngica contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae*, respectivamente, além de aumentar a

síntese de fitoalexinas em sorgo (FRANZENER et al., 2007). De forma similar, óleos essenciais extraídos de *Origanum syriacum var. bevanii* (orégano), *Lavandula stoechas subsp. stoechas* (lavanda), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*) inibiram o crescimento *in vitro* de *Phaeoisariopsis personata* e promoveram uma redução da doença acima de 60% em amendoim (KISHORE, PANDE, RAO; 2001).

A babosa (*Aloe barbadensis* Miller) é amplamente utilizada para fins medicinais e cosméticos e sua atividade antimicrobiana tem sido bem avaliada contra patógenos humanos (PANDEY; MISHRA, 2009). Porém, contra fitopatógenos poucos são os relatos. As folhas frescas podem ser usadas para obter uma fração líquida rica em compostos fenólicos e uma polpa mucilaginosa contendo polissacarídeos e ácidos orgânicos e inorgânicos (ROVATTI; BRENNAN, 1959; REYNOLDS; DWECK, 1999). A acemanana é um dos polissacarídeos mais bem estudados da babosa e tido como principal substância ativa da planta. É constituída por resíduos de manose e glucose unidos por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4) e com peso molecular de aproximadamente 1000 KDa (McANALLEY, 1993 citado por FEMENIA et al., 1999)

Jasso de Rodígues et. (2005) mostraram inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum coccodes* da batata utilizando frações líquidas da babosa. Já Saks e Barkai-Golan (1995) demonstraram atividade antifúngica da polpa da babosa contra os patógenos de pós-colheita de citros *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*. Polissacarídeos extraídos da polpa de babosa foram avaliados para o controle de patógenos em humanos (FUJITA et al., 1978), entretanto seu efeito *in vitro* em fitopatógenos e no controle de doenças em plantas não é relatado na literatura.

CAPITULO 2 - POTENCIAL DA QUITOSANA NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA EM PLANTAS DE TOMATE

2.1 Introdução

A mancha bacteriana é uma das mais importantes doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), sendo causada por diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*. A bactéria encontra condições propícias em ambientes quentes e úmidos e então pode atacar todos os tecidos da parte aérea da planta, causando grandes prejuízos (SILVA-LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005).

Um estudo feito com o intuito de identificar as espécies desse gênero que podem estar associadas à mancha bacteriana no país revelou que três espécies de *Xanthomonas* descritas na literatura (*X. axonopodis* pv *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e “*X. gardneri*”) estiveram presentes nos campos amostrados, sendo que na região do Centro-Oeste houve prevalência de *X. gardneri*. A alta frequência com que a bactéria foi obtida nessa região leva a um indicativo de que a *X. gardneri* está se tornando um importante componente do complexo da mancha bacteriana, pois até então era tratada como uma espécie de ocorrência esporádica (DUVAL, 2003). Além do observado no Centro-Oeste do Brasil, em Ontário, Canadá, *X. gardneri* também tem prevalecido (WARNER, 2003; LEBOEUF, 2005).

As medidas de controle da mancha bacteriana são de caráter preventivo, como o uso de sementes e mudas livre de patógenos, a desinfestação de instrumentos de poda e a utilização de variedades resistentes. Sabe-se que essa última é de suma importância, entretanto, a bactéria apresenta ampla diversidade genética, o que tem dificultado níveis de resistência duradouros. O uso de fungicidas cúpricos não tem promovido controle satisfatório, além de causar efeitos adversos no desenvolvimento das plantas e no ambiente, dependendo da forma como são aplicados (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Portanto, é de suma importância que medidas alternativas sejam implementadas para a contribuição no controle da mancha bacteriana do tomateiro.

Considerando o manejo integrado de doenças em plantas, que preconiza a utilização do aparato tecnológico disponível para reduzir os efeitos deletérios de patógenos, uma estratégia promissora que pode trazer grandes contribuições é a indução de resistência em plantas. Esta alternativa tem sido amplamente estudada em diversos patossistemas, os quais envolvem doenças bacterianas, fúngicas e viróticas (TONUCCI, 2004; CAMPOS et al., 2009; ANFOKA, 2000). Em tomate, diferentes

compostos têm sido pesquisados para o controle de doenças. O extrato aquoso do cogumelo *Lentinula edodes* (Le-96/17) a 10% (v/v) reduziu em 66% o número de folhas murchas em tomateiros inoculados com *Ralstonia solanacearum* em comparação com plantas controle tratadas com água e inoculadas, porém não inibiu o crescimento *in vitro* da bactéria. Adicionalmente, o extrato promoveu aumento na atividade de peroxidase aos 3 dias após o tratamento das plantas (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2008). Para a mancha bacteriana (*X. vesicatoria*), observou-se proteção de até 70% quando o extrato de *L. edodes* (Le-96/22) foi utilizado na mesma concentração (DI PIERO, 2003). Acibenzolar-S-metil (ASM) e Ecolife® promoveram aumento na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas e na deposição de lignina em folhas de tomate tratadas 4 dias antes da inoculação com *X. vesicatoria*. Além disso, o Ecolife inibiu significativamente o crescimento da bactéria (CAVALCANTI et al., 2006b). Baysal et al. (2003) verificaram aumento na atividade de peroxidase em plantas de tomate tratadas com ASM, aos 5 dias após inoculação com *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diniz e colaboradores (2006) testaram produtos alternativos para o controle da requeima do tomateiro, causada por *Phytophthora infestans*. Dentre eles, o óleo de nim mostrou-se promissor, uma vez que reduziu significativamente o progresso da doença (55% comparado à testemunha).

Nessa busca por compostos alternativos que possam se integrar ao manejo de doenças de plantas, a quitosana tem sido amplamente pesquisada. Com aplicações em diferentes áreas como agricultura, medicina, engenharia de alimentos, cosméticos, dentre outros, a quitosana pode ser obtida a partir da desacetilação da quitina encontrada na carapaça de crustáceos, por meio de processos químicos, ou da parede celular de alguns fungos como *Aspergillus niger* e *Penicillium notatum* (DEVLIEGHIERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004). É um polissacarídeo biodegradável, formado por unidades de β -1,4-glucosamina, que têm mostrado atividade tanto antimicrobiana como na proteção de plantas contra patógenos (BADAWAY; RABEA, 2008; HADWIGER; BECKMAN, 1980).

O efeito *in vitro* da quitosana está bem relatado para fitopatógenos fúngicos, como *Botrytis cinerea* (BEN-SHALOM et al., 2003), *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* do feijão (HADWIGER; BECKMAN, 1980), *Rhizopus stolonifer* do morango (EL GHAOUTH et al., 1992), *Penicillium expansum* do tomate (LIU et al., 2007), dentre outros. Entretanto, seu efeito sobre fitobactérias é pouco conhecido, com

apenas dois trabalhos mostrando a ação inibitória do polissacarídeo sobre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana da poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) (LI et al., 2008), e sobre *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia carotovora* (RABEA et al., 2009)

Quanto ao efeito protetor, plantas de pepino tratadas com quitosana a 1,0 mg/mL nos intervalos de 1, 4 e 24 horas antes da inoculação com *Botrytis cinerea* tiveram a severidade da doença reduzida em 65%, 82% e 87%, respectivamente, comparadas ao controle (plantas tratadas com água destilada). Houve um significativo aumento na atividade de peroxidases 48h após a inoculação em plantas previamente tratadas com quitosana. Além da redução na severidade da doença, foi observado um efeito direto sobre o fungo (BEN-SHALOM et al., 2003). Em cevada, a quitosana (2,0 mg/mL) reduziu significativamente a infecção causada por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* em 55,5% (FAORO et al., 2008). Observou-se que um intervalo de 3 dias entre o tratamento e inoculação foi necessário para desencadear este bom nível de resistência local, pois no intervalo de 1-2 horas não houve redução significativa.

Alguns relatos sobre o efeito da quitosana em tomate são encontrados em termos de pós-colheita ou de patógenos veiculados pelo solo. Neste último caso, Abd-El-Kareem et al. (2006) avaliaram o efeito da quitosana sobre *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Sclerotium rolfsii*, e verificaram que concentrações de 2, 4 e 6,0 mg/mL inibiram o crescimento *in vitro* dos patógenos, sendo que na maior houve inibição completa. Quando incorporada ao solo, foi notado que os patógenos foram afetados pela presença do polissacarídeo, observando-se redução de até 80% do número de propágulos dos patógenos no solo. Ademais, a quitosana promoveu aumento na atividade de quitinases em até 120% (6,0 mg/g de solo) comparada com controle (plantas crescidas em solo sem incorporação de quitosana) e uma redução na incidência da doença acima de 80%. Numa pesquisa feita por Cavalcanti et al. (2007a), com o patossistema 'tomate-*X. vesicatoria*', frações heterogêneas de quitosana obtidas do micélio de *Crinipellis pernicioso* e aplicadas em plantas 4 dias antes da inoculação, conferiram proteção de 42,7% em relação ao controle, com um aumento na atividade de peroxidases, polifoloxidases, e na lignificação. Porém, não foi observado efeito direto sobre o crescimento da bactéria.

Considerando tais aspectos, aliado ao fato de que não há relatos na literatura envolvendo indução de resistência em tomateiro contra *X. gardneri*, este trabalho foi conduzido com o intuito de verificar o efeito de quitosana na proteção de tomate contra essa bactéria, bem como

detectar mecanismos bioquímicos de resistência ativados pelo polissacarídeo. Adicionalmente, buscou-se verificar o efeito *in vitro* da quitosana sobre a bactéria.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de tomate da cv. Santa Cruz Kada, suscetível a *Xanthomonas* spp., foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Germina Planta. Aos 15 dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para vasos com 2 L de capacidade, contendo composto orgânico e terra (1:5, v/v). Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação entre os meses de outubro/2008 a junho/2009, com temperatura média de $28,3 \pm 4,6$ °C (Mínima $16,5 \pm 5,3$ e Máxima $32,7 \pm 4,1$ °C) e as plantas foram utilizadas quando apresentavam cinco folhas.

2.2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de *Xanthomonas gardneri*

Um isolado de *Xanthomonas* sp., obtido de folhas sintomáticas de tomateiro da cultivar Carmem, cultivada em Águas Mornas-SC, foi gentilmente cedido pela Empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA. A identificação da bactéria foi feita junto ao Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq) Embrapa, Brasília, DF, pela Dra. Alice Maria Quezado Duval. Constatou-se, por BOX-PCR, que o isolado trata-se de *Xanthomonas gardneri* (Grupo D). A bactéria foi mantida a 25 °C em tampão fosfato (8,6 mM K_2MPO_4 ; 7,4 mM KH_2PO_4) e, quando necessária para os experimentos, foi repicada em meio nutriente ágar (NA) [Composição (g/L): peptona de carne 5,0; extrato de carne 3,0; ágar 12,0] (Merck, Darmstadt, Alemanha) e as placas incubadas a 25 °C. O inóculo para a realização dos testes foi obtido através da suspensão de colônias bacterianas crescidas em meio NA utilizando-se água destilada. A concentração da bactéria foi ajustada para 10^8 unidades formadoras de colônias (ufc)/mL. Para a aplicação sobre as plantas, adicionou-se Tween-20 0,01% (v/v) à suspensão bacteriana.

2.2.3 Caracterização e modo de preparo das quitosanas utilizadas no estudo

Foram utilizados três tipos de quitosana: quitosana de baixo (Qbpm; 50-190 KDa) e médio peso molecular (Qmpm; 190-310 KDa) (Sigma Aldrich Chemicals, SP/Brasil) com 75-85% de desacetilação e uma quitosana comercial (Qcom) com 85% de desacetilação, gentilmente cedida pelo professor Dr. Luis Beirão, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (CAA/UFSC).

A quitosana foi preparada conforme Bhaskara Reddy et al. (1999), com algumas modificações, sendo dissolvida em ácido clorídrico (HCl) 0,05 N para a obtenção das concentrações desejadas e o pH ajustado para 5,6 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. O polissacarídeo ficou sob agitação em vórtex até completa dissolução.

2.2.4 Atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Xanthomonas gardneri*

As quitosanas (Qbpm, Qmpm e Qcom) foram preparadas conforme item 2.2.3 e, separadamente, foi preparado o meio NA (20 g/L). Todo o material foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos e, logo após, cada quitosana foi adicionada ao meio NA e a mistura foi vertida em placas de Petri. A preparação foi feita de tal forma que a concentração final da quitosana no meio foi de 4 mg/mL. Após a solidificação do meio, alíquotas de 200 µL da bactéria (10^8 ufc/mL) foram pipetadas sobre a superfície e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Como controle, foram utilizados HCl 0,05 N incorporado em NA e o meio NA puro. As placas foram incubadas a 25° C por 48 h e a avaliação realizada através da obtenção de uma suspensão bacteriana em 80 mL de água destilada e leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

Posteriormente, foi avaliado o efeito de concentrações das quitosanas sobre a fitobactéria, sendo utilizadas 0; 0,25; 1 e 4 mg/mL. O procedimento foi o mesmo descrito anteriormente, e o experimento foi repetido duas vezes. Para ambos os ensaios, foi adotado delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, com três tipos de quitosana e quatro concentrações. Foram realizadas quatro repetições/tratamento, e cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

2.2.5 Aplicação dos tratamentos nas plantas, inoculação e avaliação da doença

Plantas de tomate foram tratadas com diferentes quitosanas (Qbpm, Qmpm e Qcom), na concentração de 1 mg/mL, quando apresentavam cinco folhas. O HCl 0,05 N (pH 5,6), empregado na dissolução da quitosana, foi utilizado como controle negativo, e o acibenzolar-S-metil (ASM) a 50 mg/L, produto registrado para cultura do tomate contra a mancha bacteriana, representou o controle positivo. Foram utilizados 7 mL de cada tratamento/planta, os quais foram aspergidos em todas as folhas. Após 3 dias, foi feita a inoculação com *Xanthomonas gardneri* (10^8 ufc/mL) através de um pulverizador manual, aspergindo-se a suspensão bacteriana nas superfícies abaxial e adaxial das folhas com a manutenção das plantas em câmara úmida por 48h. Também foram avaliados intervalos de 24 e 48h entre aplicação dos tratamentos e inoculação.

Um experimento posterior foi realizado para verificar o efeito de diferentes concentrações das quitosanas sobre a doença. As plantas de tomate foram tratadas com as três quitosanas (Qbpm, Qmpm e Qcom) em quatro concentrações (0; 0,75; 1,5 e 3 mg/mL) e, após 3 dias, foram inoculadas com *X. gardneri* (10^8 ufc/mL).

Após verificar qual tratamento e concentração promoveram menor severidade da mancha bacteriana, procedeu-se um ensaio para avaliar o efeito do intervalo de tempo entre tratamento e inoculação. Foram avaliados dois intervalos, ou seja, 6 e 3 dias. Utilizou-se a Qbpm a 3 mg/mL e os procedimentos foram idênticos ao adotado para os outros ensaios.

Todos os experimentos foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado com quatro ou cinco repetições/tratamento, a depender do experimento, onde a parcela experimental foi representada por um vaso contendo duas plantas. A severidade da doença (%) foi estimada visualmente 15 dias após a inoculação, avaliando-se três folhas de cada planta, num total de seis folhas/repetições. Foram avaliadas as folhas da porção intermediária da planta.

2.2.6 Varredura espectrofotométrica de plantas de tomate tratadas com quitosana

Plantas de tomate com cinco folhas totalmente expandidas foram tratadas com 7 mL de Qbpm a 3 mg/mL e após 1, 3, 4 e 6 dias foram coletadas amostras. O HCl 0,05 N (pH 5,6) foi utilizado como

controle negativo e o ASM (50 mg/L) como positivo. A inoculação com *X. gardneri* (10^8 ufc/mL) foi feita 3 dias após os tratamentos e as plantas mantidas em câmara úmida por 48h.

Amostras constituídas de cinco folíolos (~500 mg) foram coletadas e imediatamente colocadas em 10 mL de etanol-tolueno (1:1, v/v). O tecido foi homogeneizado em almofariz durante 3 min e o extrato resultante ficou em repouso por 15 min. Após esse tempo, o extrato foi filtrado em papel filtro Qualy® ($\varnothing = 9,0$ cm) sob vácuo, depositado em frasco âmbar e realizou-se uma troca de atmosfera com nitrogênio gasoso. Os frascos foram armazenados a -20 °C até o uso. Os extratos foram diluídos em etanol-tolueno na proporção de 1:5 e submetidos à varredura espectrofotométrica (U-1800 spectrophotometer), com leitura da absorbância de 260 a 750 nm, utilizando-se o software Hitachi IV Solutions Application. Foi realizada uma varredura para cada amostra e os resultados foram expressos pela média das absorbâncias de quatro repetições.

2.2.7 Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides

Plantas de tomate, cv. Santa Cruz Kada, foram submetidas a diferentes tratamentos quando apresentavam cinco folhas: Qbpm 3 mg/mL, ASM 50 mg/L e HCl 0,05 N (pH 5,6), e inoculadas ou não com *X. gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL) após 3 dias dos tratamentos. Os tempos de amostragem foram 0, 3, 4 e 6 dias após os tratamentos e o tecido foliar coletado foi imediatamente congelado a -20 °C

A quantificação de compostos fenólicos foi feita de acordo com McCue et al. (2000), com modificações. Para cada amostra, 0,1 g de tecido foliar fresco foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo em nitrogênio líquido e homogeneizado com 3 mL de metanol 80 % acidificado (metanol:HCl = 80:1, v/v). O extrato foi incubado no escuro por 1 h em temperatura ambiente e, após esse tempo, filtrado à vácuo, utilizando papel de filtro Qualy® ($\varnothing = 9,0$ cm). Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi misturada com 0,5 mL de metanol 95% (v/v) e agitados em vórtex. A essa mistura foram adicionados 1 mL de etanol 95%, 1 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 min, acrescentou-se 1 mL de Na_2CO_3 5% (m/v), e a amostra foi incubada no escuro por 1 h. A absorbância da solução final foi mensurada a 725 nm em espectrofotômetro e a quantificação de fenólicos foi baseada em uma curva padrão (0,5-100 μg) de ácido gálico. Os resultados foram

expressos em μg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca ($\mu\text{g EAG g}^{-1}\text{ MF}$).

Para a quantificação de flavonóides, 0,1 g de tecido foliar fresco foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo em nitrogênio líquido e homogeneizado com 5 mL de etanol 99%. O extrato foi incubado no escuro por 1 h em temperatura ambiente e, após esse tempo, filtrado à vácuo, utilizando papel filtro Qualy® ($\varnothing = 9,0\text{ cm}$) e concentrado por meio do evaporador rotativo. A amostra foi ressuspensa em 5 mL de metanol 99,9%. A determinação de flavonóides totais foi feita através do método espectrofotométrico (WOISKY; SALATINO, 1998), misturando-se 0,5 mL da amostra, 2,5 mL de etanol 99% e 0,5 mL de cloreto de alumínio a 2% (em metanol). Após uma hora de repouso no escuro, mensurou-se a absorvância a 420 nm e o teor de flavonóides foi expresso em μg de equivalentes de quercetina por g de massa fresca ($\mu\text{g EQ g}^{-1}\text{ MF}$).

2.2.8 Determinação da atividade de peroxidases e glucanases

Para determinar a atividade de peroxidases e glucanases em plantas de tomate submetidas aos mesmos tratamentos descritos no item 2.2.7, amostras de tecido foliar (cinco folíolos) foram coletadas e imediatamente congeladas a -20°C . O tecido foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo em nitrogênio líquido e homogeneizado por 2 min em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,2), contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, polivinilpirrolidona 1% (PVP) e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM (PMSF). A solução obtida foi centrifugada a 20.000 g por 30 min e o sobrenadante (extrato protéico) recuperado. Todo o processo foi conduzido a 4°C .

A atividade da peroxidase foi determinada através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol como descrito por Hammerschmidt, Nuckles e Kuc (1982), com algumas modificações. A reação consistiu da adição de 20 μL do extrato protéico em 2,9 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM. A reação foi conduzida por 4 min a 30°C , com os valores de densidade óptica sendo tomados a cada 30 s. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470 nm por mg de proteína por minuto ($\text{DO}_{470\text{ nm}}\text{ mg proteína}^{-1}\text{ min}^{-1}$).

A atividade de glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina (*Laminaria digitata* – Sigma Aldrich Chemicals, SP/Brasil). A reação

envolveu 25 μL do extrato protéico e 475 μL de laminarina (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão acetato de sódio 0,1 M, (pH 5,2), os quais foram incubados a 44 °C por 1 h. Aliquotas de 30 μL foram retiradas da mistura incubada e diluídas em 470 μL de água destilada para a dosagem dos açúcares redutores liberados na reação, pelo método de Lever (1972). Para tanto, 1,5 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 1% (PAHBAH) foi adicionado aos 500 μL da solução final e, após incubação a 100 °C por 5 min, foi feita leitura a 410 nm em espectrofotômetro. De cada amostra foi subtraído o valor do “branco”, contendo a mesma reação descrita para a amostra, porém, sem incubação. A atividade de glucanases foi expressa em μKatal por mg proteína ($\mu\text{Katal mg proteína}^{-1}$), sendo 1 Katal definido como a atividade enzimática catalisando a formação de 1 mol de equivalente-glicose/segundo.

2.2.9 Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL)

Para a atividade da FAL, amostras de tecido foliar submetidas aos mesmos tratamentos descritos no item 2.2.7 foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão borato de sódio 25 mM (pH 8,8) contendo EDTA 1 mM e PVP (0,5 %). A solução obtida foi centrifugada a 20.000 *g* por 30 min e o sobrenadante (extrato protéico) recuperado. Todo o processo foi conduzido a 4 °C.

A atividade enzimática foi determinada segundo Falcón et al. (2008), com algumas modificações. Como substrato, foi utilizada fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). Em 450 μL do substrato, foram adicionados 50 μL do extrato protéico e a mistura incubada a 40 °C por 1h. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de HCl 5 N e banho de gelo por 5 min. Finalmente, 300 μL de água foram adicionados e a absorbância da solução final mensurada a 290 nm. Os resultados foram expressos como nmol de ácido *trans*-cinâmico formado por mg de proteína por minuto de reação ($\text{nmol ácido } trans\text{-cinâmico mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

2.2.10 Delineamento experimental das análises bioquímicas

O experimento para determinações enzimáticas e metabólitos secundários foi montado sob delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições/tratamento. Uma repetição foi representada por

uma planta e de cada uma delas, cinco folíolos (~500 mg) foram coletados aleatoriamente para as análises.

2.2.11 Dosagem de proteínas totais

A quantificação de proteínas solúveis nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em um volume de 800 μL , acrescentaram-se 200 μL do reagente “coomassie brilliant blue” (CBB). As leituras de absorbância das soluções foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores de absorbância dos extratos foram convertidos em concentração de proteína solúvel, por comparação com as leituras de soluções padrões de albumina de soro bovino (BSA), de 2,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.12 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA *one way* ou fatorial) e o teste de Tukey (comparações múltiplas) foram realizados para verificar a diferença entre as médias das variáveis analisadas nos experimentos. Quando os dados não apresentaram homogeneidade de variâncias, aplicou-se uma análise não paramétrica Kruskal-Wallis e a comparação entre os tratamentos foi feita de forma independente pelo teste Mann-Whitney. Análise de regressão foi requerida para verificar o efeito de concentração dos tratamentos.

As análises foram conduzidas utilizando os softwares estatísticos Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007) e Sisvar (FERREIRA, 2003).

2.3 Resultados

2.3.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Xanthomonas gardneri*

A avaliação inicial com as quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm a 4 mg/mL, incorporadas em meio de cultura NA, mostrou um efeito altamente inibitório dos polissacarídeos sobre a bactéria. O crescimento bacteriano foi normalmente verificado no meio NA contendo HCl (Figura 3).

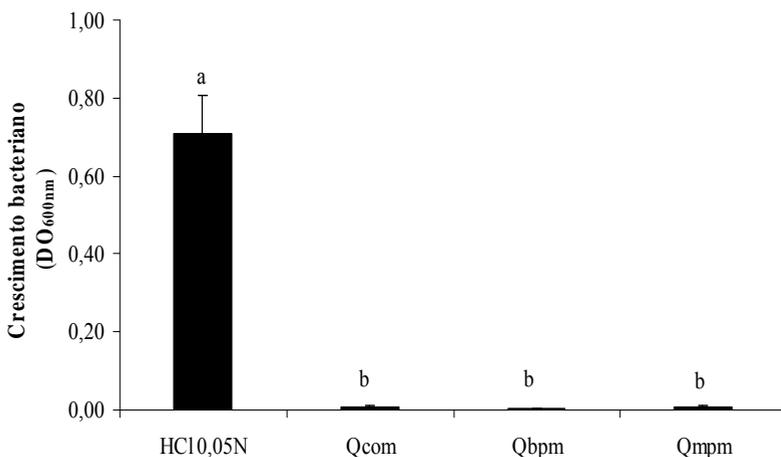


Figura 3 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), utilizadas a 4 mg/mL, no crescimento *in vitro* de *Xanthomonas gardneri* representado pela densidade óptica da suspensão de células a 600 nm. As quitosanas e o controle HCl 0,05N foram incorporados no meio de cultura nutriente-ágar (NA). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Em outro experimento em que se avaliou o efeito de concentrações das quitosanas sobre a bactéria, os polissacarídeos a 0,25 mg/mL não afetaram o crescimento de *X. gardneri*, mas a 1 mg/mL notou-se efeito significativo, com a Qcom e Qbpm apresentando maiores inibições. Este experimento foi repetido duas vezes, e como os resultados foram similares, um dos experimentos foi escolhido para ilustrar os resultados. Como os dados não apresentaram homogeneidade, além de não se adequarem às transformações, não foi possível analisá-los por meio de uma regressão, sendo requerida uma estatística não paramétrica (Figura 4).

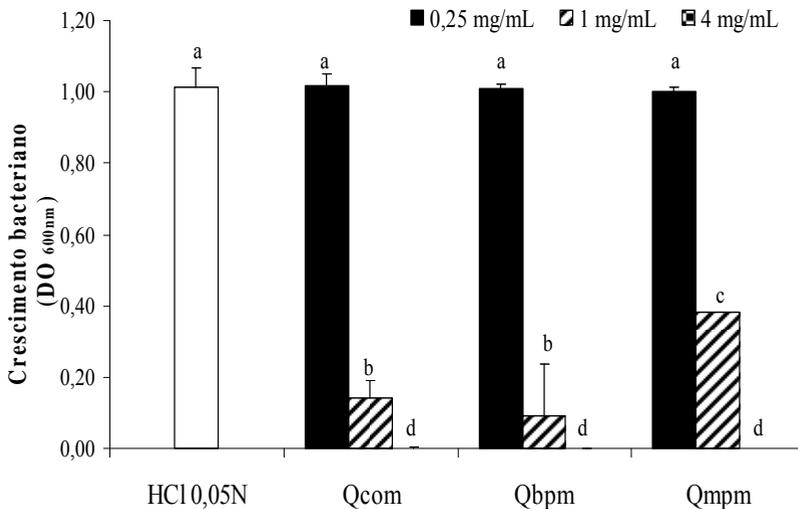


Figura 4 - Atividade antimicrobiana *in vitro* da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Xanthomonas gardneri* representado pela densidade óptica da suspensão celular a 600 nm. As quitosanas e o controle HCl 0,05N foram incorporados no meio de cultura nutriente-ágar (NA). Os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis e a comparação entre os tratamentos feita de forma independente pelo teste Mann-Whitney para $p < 0,05$.

2.3.2 Efeito da pulverização foliar da quitosana sobre a severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate

Em nenhum dos experimentos foi observado efeito fitotóxico das quitosanas sobre o tomateiro. Os tratamentos com as quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm a 1 mg/mL conferiram uma redução de, aproximadamente, 70% na severidade da doença, quando pulverizados 3 dias antes da inoculação com *X. gardneri*. O efeito foi similar àquele proporcionado pelo ASM (Figura 5).

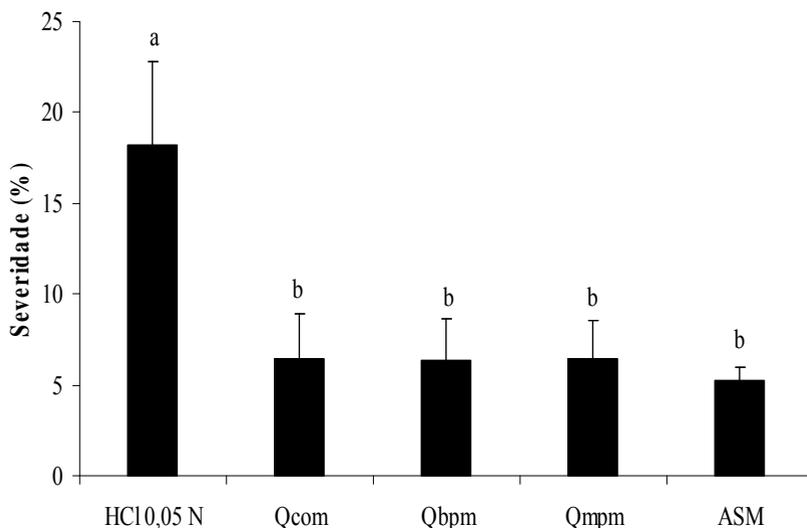


Figura 5 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), a 1mg/mL, na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*). HCl 0,05 (pH 5,6) representa o controle negativo e o Acibenzolar-S-metil (ASM) a 50 mg/mL, o controle positivo. Os tratamentos foram aplicados nas plantas 3 dias antes da inoculação com a bactéria (10^8 ufc/mL) e a avaliação da severidade da doença feita 15 dias após a inoculação. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

A redução do intervalo entre a aplicação das quitosanas e a inoculação da bactéria para 48 h e 24 h não proporcionou aumento significativo no nível de controle da bacteriose em relação ao intervalo de tempo de 3 dias (Figura 6).

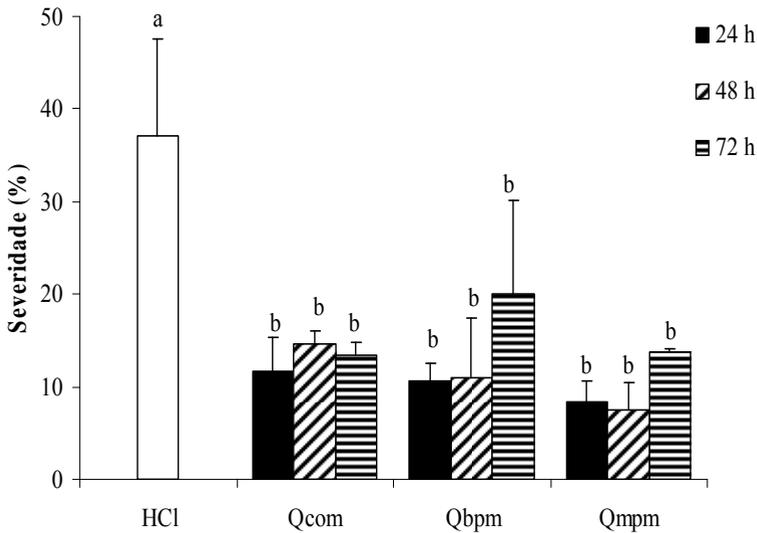


Figura 6 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), a 1mg/mL, na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*; 10^8 ufc/mL). As quitosanas foram pulverizadas em diferentes intervalos antes da inoculação. HCl 0,05 (pH 5,6) representa o controle negativo aplicado 72h antes da inoculação. A avaliação da severidade da doença foi realizada 15 dias após a inoculação. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A ANOVA fatorial para quitosanas e concentrações não acusou diferença estatística para a primeira variável. Quanto às concentrações, houve um efeito dose-dependente, com maior redução na severidade da doença a 3 mg/mL. Os tratamentos foram aplicados 3 dias antes da inoculação e não diferiram entre si. Como não houve diferença entre as quitosanas, a Figura 7 representa uma análise de regressão linear com valores médios das três quitosanas.

Em todos os experimentos, as quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm não apresentaram diferenças significativas entre si quanto à proteção conferida às plantas de tomate contra a mancha bacteriana.

Entretanto, a quitosana de baixo peso molecular (Qbpm) foi a que apresentou menores valores médios de severidade e foi utilizada nos experimentos posteriores.

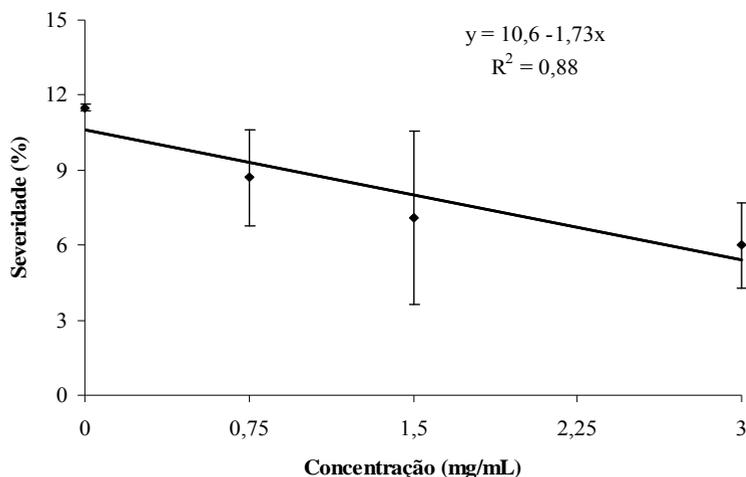


Figura 7 - Efeito de concentrações (0; 0,75; 1,5; 3,0 mg/mL) da quitosana comercial, de baixo peso e médio peso molecular na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*; 10^8 ufc/mL). Os tratamentos foram aplicados 3 dias antes da inoculação e a avaliação realizada aos 15 dias após a inoculação. Linhas verticais no gráfico representam o desvio-padrão. Houve efeito de concentração das quitosanas sobre a mancha bacteriana pelo teste F a 5%.

Considerando que os intervalos entre tratamento e inoculação de 24 a 72 h não foram diferentes no nível de proteção conferido pelas quitosanas, foi avaliado um intervalo de tempo superior. Utilizou-se a Qbpm 3 mg/mL e as plantas de tomate foram inoculadas com *X. gardneri* 6 dias após o tratamento. Com esse intervalo, não foi observada redução na severidade da mancha bacteriana pela Qbpm, comparada ao controle HCl 0,05 N. O ASM foi efetivo na redução da doença quando aplicado tanto aos 3 como aos 6 dias antes da inoculação (Figura 8).

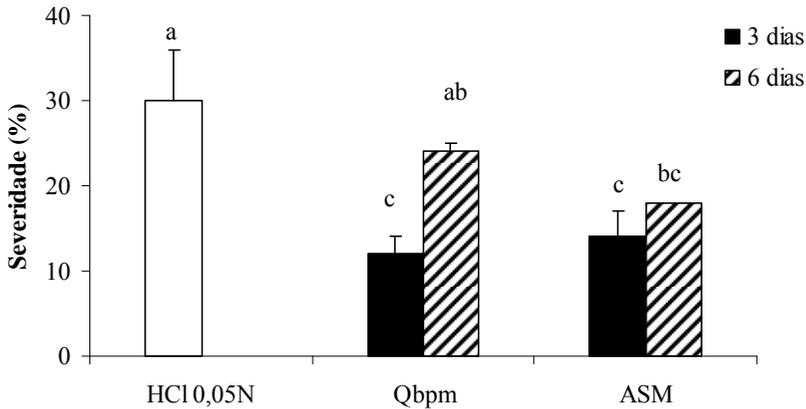


Figura 8 – Efeito de intervalos de tempo entre os tratamentos [quitosana baixo peso molecular (Qbpm), a 3 mg/mL; Acibenzolar-S-metil (ASM), a 50 mg/L; e HCl 0,05N (pH 5,6)] e a inoculação, na severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*; 10^8 ufc/mL). O HCl 0,05N, utilizado como controle, foi aplicado 6 dias antes da inoculação. A avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação. Barras (médias \pm desvio-padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

2.3.3 Perfil espectrofotométrico, quantificação de compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade da FAL

Na figura 9, observam-se os perfis espectrofotométricos dos tratamentos em diferentes intervalos de tempo. Por não haver diferenças no perfil entre 200-260 nm nos dias avaliados, os dados são apresentados a partir desse último comprimento de onda. Aos 4 dias após os tratamentos, houve aumento significativo na absorvância a 280-300 nm em plantas tratadas (inoculadas) com Qbpm e ASM em relação à testemunha (Tabela 2).

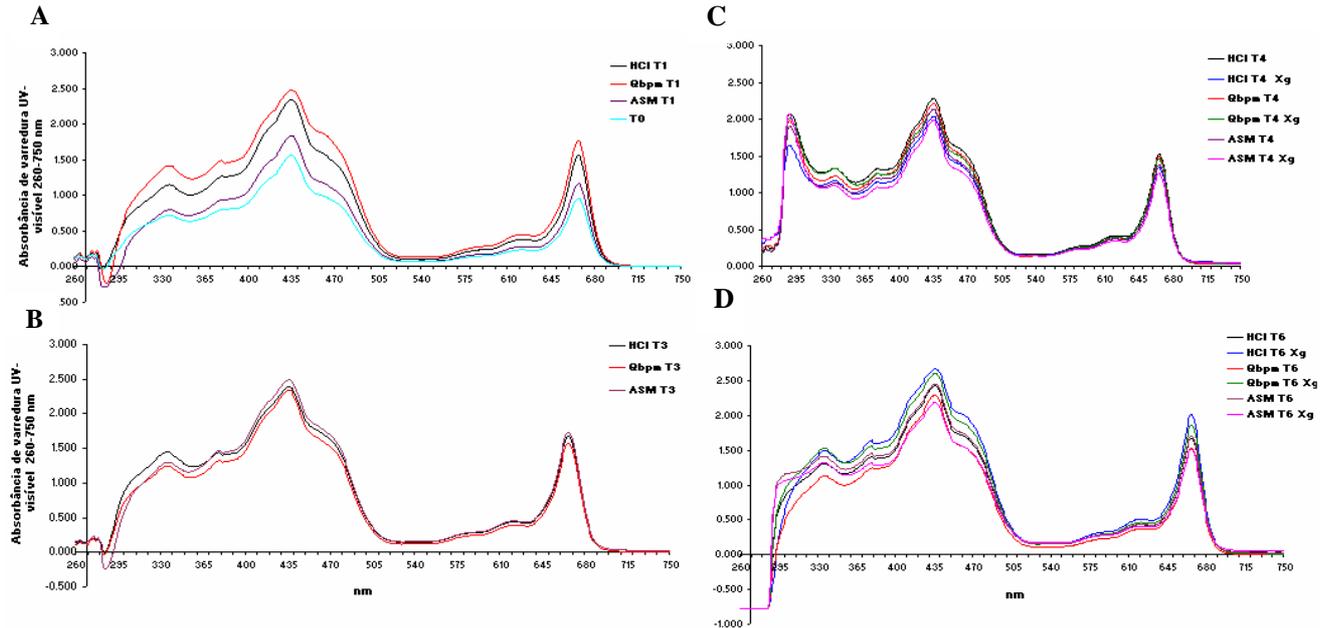


Figura 9 - Perfil espectrofotométrico do extrato etanol-tolueno de plantas tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm), Acicbenzolar-S-metil (ASM) e HCl 0,05 N (pH 5,6), inoculadas ou não com *X. gardneri* (Xg; 10^8 ufc/mL), 1 (A), 3 (B), 4 (C) e 6 (D) dias após os tratamentos. T0 = testemunha absoluta.

Tabela 2 - Valores médios de absorvância na faixa entre 280 e 300 nm em plantas de tomate tratadas, e inoculadas ou não com *Xanthomonas gardneri*, 4 dias após o tratamento (T4).

Tratamento	Absorbância em T4 (280-300nm)	
	Plantas não inoculadas	Plantas inoculadas
HCl 0,05N	1,808±0,310 a A ^[1]	1,444±0,215 a B
Qbpm	1,705±0,298 a A	1,755±0,303 b A
ASM	1,634±0,293 a A	1,746±0,298 b A

^[1] Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Em experimento para a análise do conteúdo de compostos fenólicos totais em folhas de tomateiro, verificou-se que o mesmo permaneceu praticamente constante até o quarto dia após os diferentes tratamentos. Entretanto, no sexto dia após os tratamentos (correspondente a 3 dias após a inoculação), houve um aumento significativo na quantidade desses compostos em plantas tratadas com Qbpm ou ASM e inoculadas com *X. gardneri*, comparadas com o controle HCl 0,05 N inoculado (Figura 10). Para o conteúdo de flavonóides, efeito similar foi observado para o tratamento com quitosana, que promoveu um aumento significativo desses compostos aos 3 dias após a inoculação com a bactéria. Já plantas tratadas com ASM e inoculadas com *X. gardneri* não diferiram do controle (Figura 11).

A atividade da FAL também apresentou um aumento pronunciado aos 6 dias após o tratamento com Qbpm (e 3 dias após inoculação com *X. gardneri*), no entanto, não significativo comparado ao controle HCl 0,05 N (Figura 12).

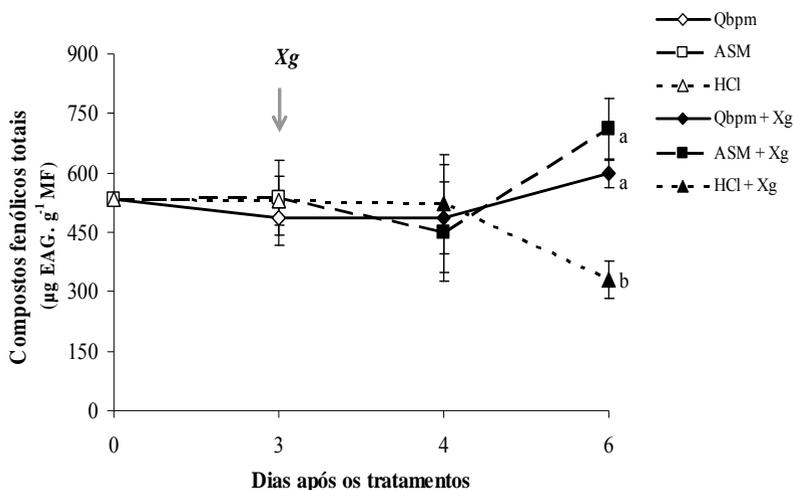


Figura 10 - Alteração no conteúdo médio de compostos fenólicos totais, expresso em μg de equivalente ácido gálico (EAG) por massa fresca (MF), em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm a 3 mg/mL - ◇, ◆), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - □, ■) ou HCl 0,05 N (△, ▲) e inoculadas (◆, ■, ▲) ou não (◇, □, △) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Dentro de cada dia de avaliação, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

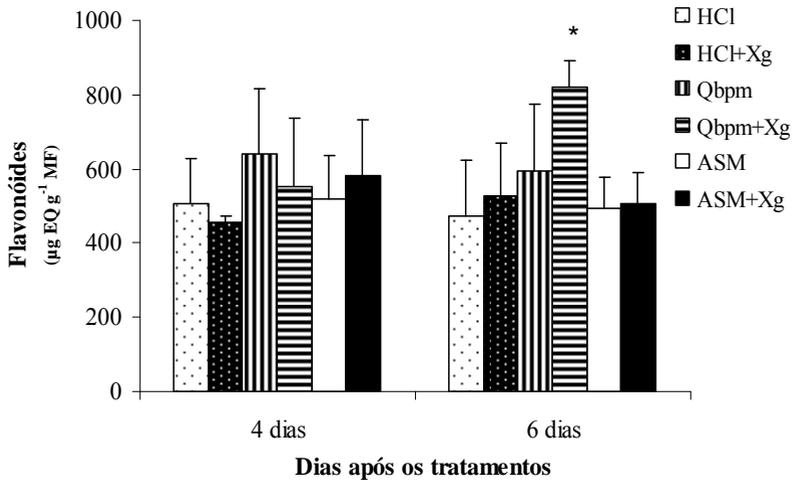


Figura 11 - Alteração no conteúdo médio de flavonóides, expresso em μg de equivalente quercetina (EQ) por massa fresca (MF) em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular a 3 mg/mL (Qbpm), acibenzolar-S-metil a 50 mg/L (ASM) ou HCl 0,05 N e inoculadas ou não com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL) 3 dias após o tratamento. Barras de erros indicam o desvio padrão. O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle (HCl+Xg) pelo teste Dunnet a 5 % de significância.

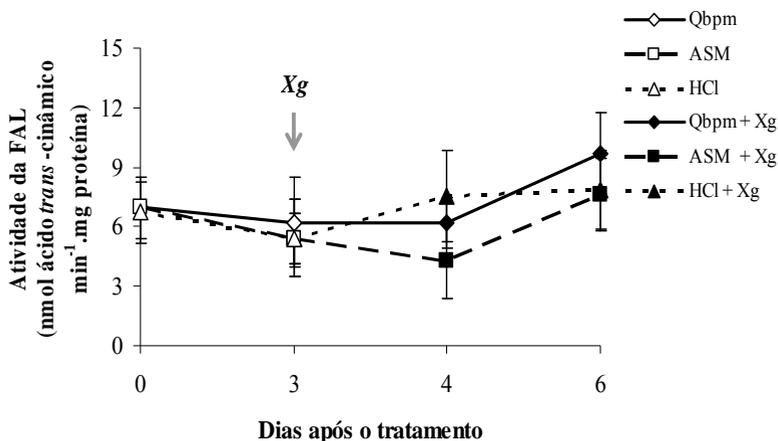


Figura 12 - Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm a 3 mg/mL - ◇, ◆), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - □, ■) ou HCl 0,05 N (△, ▲) e inoculadas (◆, ■, ▲) ou não (◇, □, △) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste F em nível de 5% de significância.

2.3.4 Atividade de peroxidases e glucanases em folhas de tomateiro tratadas com quitosana

A partir dos 4 dias após os tratamentos (1 dia após a inoculação com *X. gardneri*), observa-se um aumento considerável da atividade de peroxidases em plantas de tomateiro tratadas com Qbpm + Xg, comparado ao HCl 0,05 N + Xg ($p = 0,09$), sendo que aos 6 dias após o tratamento (3 dias após a inoculação), detectou-se efeito significativo entre tais tratamentos ($p = 0,03$). O ASM apresentou efeito similar ao da quitosana, mas não significativo comparado ao HCl aos 6 dias após o tratamento (Figura 13).

Quanto às β ,1-3 glucanases, foi observado que após 3 dias da aplicação dos tratamentos houve um aumento na atividade enzimática ao longo do tempo. Embora aos 4 dias após o tratamento com Qbpm (1 dia após inoculação) os níveis da atividade enzimática continuassem a subir, no sexto dia houve uma queda na mesma (Figura 14). Ao longo

do tempo avaliado, não notou-se incrementos significativos na atividade de glucanases após o tratamento com quitosana ou ASM comparados ao HCl 0,05 N.

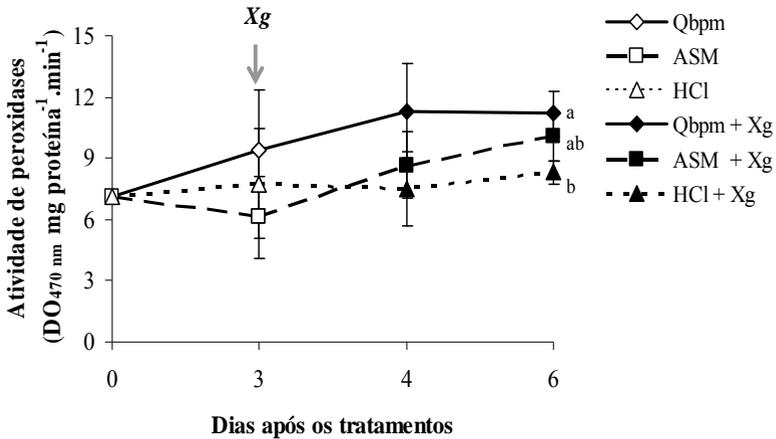


Figura 13 - Atividade de peroxidases em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm a 3 mg/mL - ◇, ◆), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - □, ■) ou HCl 0,05 N (△, ▲) e inoculadas (◆, ■, ▲) ou não (◇, □, △) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Dentro de cada dia de avaliação, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

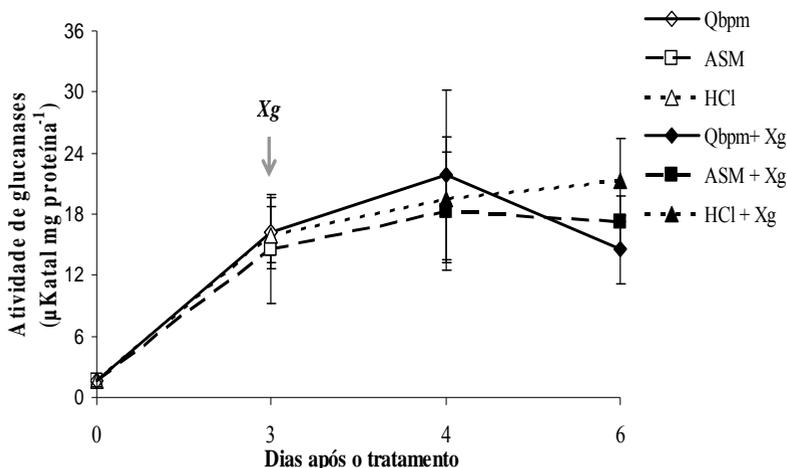


Figura 14 - Atividade de glucanases em folhas de tomateiro tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm a 3 mg/mL - ◇, ◆), acibenzolar-S-metil (ASM a 50 mg/L - □, ■) ou HCl 0,05 N (△, ▲) e inoculadas (◆, ■, ▲) ou não (◇, □, △) com a bactéria *Xanthomonas gardneri* (Xg) (10^8 ufc/mL). A seta indica o momento da inoculação com a bactéria. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste F em nível de 5% de significância.

2.4 Discussão

No presente estudo, a quitosana promoveu o controle da mancha bacteriana em até 70%, com concentrações variando de 0,75 a 3 mg/mL quando aplicada 3 dias antes da inoculação das plantas de tomate. Resultados similares em termos de proteção de plantas foram obtidos por Ben-Shalom et al. (2003), em que a quitosana promoveu uma redução do mofo cinzento de 65%, 82% e 87%, quando aplicada 1, 4 ou 24 h antes da inoculação com *Botrytis cinerea*, respectivamente. Embora estes autores tenham encontrado níveis de controle maiores que os obtidos neste estudo, os intervalos entre tratamento e inoculação adotados foram bem menores, além disso, a concentração da quitosana utilizada foi de 5 mg/mL.

Em plantas de fumo, a aplicação foliar de quitosana a 0,5 mg/mL, 5 dias antes da inoculação, conferiu uma proteção de 55% contra *Phytophthora parasitica nicotianae* comparado ao controle

(FALCÓN et al., 2008). Nesse caso, os autores concluíram que o efeito protetor observado foi devido à indução de resistência sistêmica, aferida pela alta atividade de glucanases, já que o polissacarídeo foi aplicado na parte aérea da planta e a inoculação feita no sistema radicular. O efeito direto sobre *P. parasitica* foi observado em testes *in vitro*. Para o feijoeiro, a quitosana conferiu uma proteção maior que 50 % contra a antracnose quando aplicada a 2 mg/mL aos 5 dias antes da inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*, e um aumento na atividade de glucanases. Além disso, a quitosana reduziu o crescimento micelial do fungo e inibiu a germinação de conídios (DI PIERO; GARDA, 2008).

Nota-se que as respostas de uma planta a determinados agentes eliciadores dependem, dentre outros aspectos, do patógeno envolvido, da concentração do eliciador e de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência, que segundo Hammerschmidt e Kuc (1982) pode demorar alguns dias a uma semana. Plantas de tomate tratadas com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm) a 3 mg/mL mostraram uma proteção contra a mancha bacteriana quando o polissacarídeo foi aplicado em intervalos de 24, 48 e 72 h antes da inoculação. Por outro lado, um intervalo superior (6 dias) não foi eficiente.

A proteção de plantas conferida pela quitosana pode se dar tanto por um efeito direto sobre o patógeno, como por uma ativação de mecanismos de defesa nos tecidos das plantas. No presente estudo, ficou evidente a atividade antibacteriana da quitosana comercial e daquelas de baixo e médio peso molecular sobre *X. gardneri*. Além disso, o crescimento bacteriano foi normalmente verificado em meio NA acrescido de HCl 0,05 N (pH 5,6), mostrando que a acidificação do meio NA para o valor de 5,9 (o pH normal desse meio é igual a 7,0) não interferiu no desenvolvimento da bactéria.

A maioria dos trabalhos presente na literatura que demonstra o efeito antimicrobiano da quitosana relata o efeito sobre patógenos de origem fúngica (HADWIGER; BECKMAN, 1980; BEN-SHALOM et al., 2003; CHIEN; SHEU; LIN, 2007; GUO et al., 2006; HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008). Pouco se sabe sobre o efeito do polissacarídeo em fitobactérias. Somente em 2008 foi publicado o primeiro trabalho por Li et al. em que os mesmos demonstraram a atividade da quitosana sobre *X. arboricola* pv. *poinsettiiicola* e *X. axonopodis* pv. *poinsettiiicola*, causadoras da mancha bacteriana da poinsetia. Para essas espécies de bactéria, a inibição máxima foi verificada a 0,1 mg/mL, em contrapartida, nas condições realizadas no presente estudo, só foi observada efeito significativo das quitosanas a

partir de 1 mg/mL, com o uso de quitosanas apresentando peso molecular entre 50-190 (Qbpm) e 190-310 KDa (Qmpm). No trabalho de Li et al. (2008), embora tenha sido observado um efeito da quitosana sobre as bactérias em concentrações relativamente baixas, não há menção do peso molecular da quitosana utilizada. Em 2009, Rabea et al. (2009) mostraram que uma quitosana de baixo peso molecular a 0,5 mg/mL e a 1,05 mg/mL apresentaram atividade antibacteriana contra *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia carotovora*, respectivamente, o que se assemelha ao encontrado para *X. gardneri*. Cavalcanti e colaboradores (2007a) relataram efeito de frações heterogêneas de quitosana obtida do micélio de *Crinipellis perniciosa* na interação tomate-*X. vesicatoria*, entretanto sem efeito sobre a bactéria.

Benhamou et al. (1998) avaliaram diferentes concentrações de quitosana sobre uma linhagem de *Bacillus pumilus*, rizobactéria promotora de crescimento em planta. O objetivo era encontrar uma concentração que não afetasse negativamente a bactéria agente de biocontrole, de modo a combinar quitosana e *Bacillus* em um tratamento integrado visando o controle da murcha de *Fusarium* em tomateiro. Por análise macroscópica e ultraestrutural, feita em microscópio eletrônico de transmissão, as concentrações de 1 e 2 mg/mL de quitosana não afetaram o crescimento nem as células bacterianas do agente de biocontrole. Em contrapartida, concentrações maiores provocaram vários níveis de alterações nas células, como distorções na parede celular, desorganização citoplasmática e até mesmo destruição da parede celular, a 4 mg/mL. A quitosana a 1 mg/mL foi então selecionada para os testes subseqüentes já que teve um efeito neutro sobre a rizobactéria.

Diferentes características podem interferir na atividade biológica da quitosana, dentre elas a sua natureza catiônica. O que tem sido sugerido é que existe uma interação entre as cargas positivas do polissacarídeo com os resíduos de carga negativa das macromoléculas expostos na superfície da célula do patógeno, o que pode resultar em alteração da permeabilidade da membrana, com liberação do conteúdo celular para o meio (BENHAMOU, 1996). As quitosanas utilizadas nesse estudo apresentaram grau de desacetilação similares, em torno de 85%, o que parece ter sido suficiente para possibilitar interação entre os grupamentos amino do polissacarídeo (concentração acima de 1 mg/mL) com grupamentos negativamente carregados da membrana bacteriana. Entretanto, ainda é necessário que estudos adicionais sejam realizados para elucidar os mecanismos de atuação da quitosana sobre *X. gardneri*, considerando-se diferentes propriedades como peso molecular e grau de desacetilação da molécula.

Um outro atributo que interfere na atividade biológica da quitosana é o peso molecular. Estudos realizados com fungos mostraram que quanto menor o peso molecular, maior é a atividade antifúngica da quitosana (BADAWAY; RABEA, 2008; CHIEN; SHEU; LIN, 2007). A quitosana de baixo peso molecular utilizada neste estudo mostrou um efeito levemente maior sobre *X. gardneri* que a de médio peso, sobretudo quando utilizada a 1 mg/mL. Hernández-Laurazo et al. (2008) mostraram efeito similar, em que uma quitosana de baixo peso molecular foi mais efetiva que a de médio e alto peso molecular, em inibir o crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*, quando utilizada em concentrações de 1 a 2 mg/mL. Em outro estudo foi verificado um maior efeito para quitosana de baixo peso molecular, em concentrações de 0,01-1 mg/mL, sobre o *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* (LIU et al., 2007). A hipótese mais aceita para o maior efeito antimicrobiano das quitosanas de baixo peso molecular é a de que polímeros menores conseguem atravessar a membrana plasmática dos microrganismos com mais facilidade e provocar morte celular. Em estudo feito com bactérias patogênicas humanas, Zheng e Zhu (2003) relataram que a quitosana forma uma membrana polimérica na superfície da célula, impedindo a entrada de nutrientes. Além disso, a quitosana de baixo peso molecular entra na célula e, pela sua natureza catiônica, pode absorver as substâncias eletronegativas e floculá-las, perturbando as atividades fisiológicas das células, levando-as à morte. Yakovlev et al. (2007) mostraram ainda que uma quitosana de baixo peso molecular é eficiente em inibir RNAase de bactérias.

No que tange ao efeito sobre o metabolismo da planta, muitos pesquisadores têm demonstrado a capacidade da quitosana em induzir resistência contra fitopatógenos. Essa alteração resulta da indução de marcadores bioquímicos como proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas, compostos fenólicos, além de compostos estruturais como lignina e calose (BHASKARA REDDY et al., 1999; ZHANG; QUANTICK, 1997). Considerando a diversidade de mecanismos e compostos associados à indução de resistência em plantas, neste trabalho foi feita uma varredura espectrofotométrica de plantas tratadas com quitosana, e inoculadas com *X. gardneri*, para observar quais as classes de compostos poderiam ter sua biossíntese estimulada pelo tratamento com o polissacarídeo, já que o mesmo promoveu uma redução na severidade da mancha bacteriana. O perfil espectrofotométrico mostrou um aumento da absorbância entre os comprimentos de onda de 280-300 nm após 4 dias do tratamento (1 dia após inoculação), indicando que a quitosana pode ter condicionado as

plantas a sintetizarem diferentes classes de compostos em resposta à fitobactéria. Os picos entre 645-680 nm, observados em todos os espectros, são típicos de absorção por clorofilas.

Sabe-se que compostos fenólicos, flavonóides, dentre outros, podem absorver a luz na faixa de comprimento de onda de 280 a 300 nm. Considerando esse aspecto, foram conduzidos alguns testes para quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais e de flavonóides em diferentes intervalos após o tratamento de plantas com Qbpm, ASM e HCl 0,05 N, inoculadas ou não com *X. gardneri*. Houve um acúmulo significativo de fenólicos totais em plantas tratadas com quitosana (Qbpm 3 mg/mL) ou ASM e inoculadas com *X. gardneri*, em relação ao controle. Quanto aos flavonóides, um efeito similar foi observado, com acúmulo significativo em plantas tratadas com quitosana e inoculadas com a bactéria. Já o tratamento com ASM não diferiu do controle.

Os fenóis podem ser sintetizados por duas rotas metabólicas: a do ácido chiquímico e do ácido malônico. A primeira via resulta na biossíntese da maioria dos fenólicos nas plantas e tem como enzima chave a fenilalanina amônia-liase (FAL). Esta enzima catalisa a β -eliminação da amônia a partir da L-fenilalanina para formar ácido *trans*-cinâmico, um precursor dos fenilpropanóides. Esses são importantes constituintes da parede celular e da lignina, além de apresentarem efeitos tóxicos sobre patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2009; CLIVE LO; NICHOLSON, 2008). O aumento de fenólicos totais e flavonóides verificado esteve associado à atividade da FAL, que também esteve elevada aos 6 dias após o tratamento com quitosana, embora este não tenha diferido estatisticamente do controle. Esse aumento na atividade enzimática e dos polifenóis podem ter contribuído para a redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro após o tratamento com a quitosana.

Bhaskara Reddy et al. (1999) mostraram que no patossistema trigo-*Fusarium graminearum*, a síntese de ácidos fenólicos foi estimulada pelo tratamento prévio com quitosana e o nível destes compostos aumentou significativamente com o aumento da concentração da quitosana (2, 4, 6 para 8 mg/mL). Os autores sugerem que o acúmulo de vários derivados do ácido *trans*-cinâmico observado no trabalho se deve ao fato de que a quitosana ativa a via dos fenilpropanóides. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com esses autores, pois houve uma elevação no conteúdo de fenóis totais e flavonóides aos 3 dias após a inoculação, além de um aumento na atividade da FAL nesse mesmo período. Os compostos fenólicos são bem conhecidos como substâncias antimicrobianas e

podem estar envolvidos tanto em mecanismos bioquímicos como estruturais de defesa em plantas. Durante a infecção de plantas, pode ocorrer um rápido acúmulo, oxidação e polimerização de compostos fenólicos no sítio da infecção que limita o desenvolvimento do patógeno. Além dessa atuação direta, alguns materiais fenólicos são importantes componentes da parede celular das plantas e conseqüentemente auxiliarão na contenção do patógeno e na restrição do aumento da lesão (NICHOLSON; HAMMERSCHIMIDT, 1992; RIDE, 1975). Os flavonóides, que constituem um grupo de polifenóis, são importantes na expressão da defesa e são considerados componentes-chave da resistência em sorgo. Nessa cultura, flavonóides pigmentados (3-deoxiantocianidinas) têm a função de fitoalexinas com função antimicrobiana e se acumulam rapidamente em resposta à infecção (CLIVE LO; NICHOLSON, 2008). Em algumas culturas, o tratamento prévio com eliciadores aumenta a biossíntese de flavonóides, como o que ocorreu em plantas de arroz submetidas ao tratamento com quitosana, que aumentou a produção da sacuranetina (AGRAWAL et al. 2002). Esses resultados corroboram os obtidos neste trabalho, indicando que a quitosana atua na rota dos fenilpropanóides.

Além da importante atuação de metabólitos secundários na defesa de plantas contra patógenos, diferentes proteínas relacionadas à patogênese podem ser induzidas pelo tratamento com eliciadores e subseqüente inoculação com patógeno. As β -1,3-glucanases atuam diretamente sobre patógenos, degradando a parede celular, e os oligômeros liberados a partir de sua atividade servem como moléculas sinalizadoras. A atividade dessa enzima em plantas de tomate foi alterada pela quitosana, após 3 dias do tratamento, entretanto, após a inoculação das plantas, não foi observado um efeito pronunciado. Schneider e Ullrich (1994) também não observaram uma boa relação entre atividade de β -1,3-glucanases e a indução de resistência em folhas de pepino, quando as plantas foram previamente tratadas com eliciadores e desafiadas com o patógeno. Em plantas de feijão, a depender da cultivar utilizada, foi verificada uma menor atividade de β -1,3-glucanase, aos 5 e 10 dias após o tratamento com a quitosana (RODRIGUES et al., 2006). Em fumo, o nível de expressão do mRNA da β -1-3 glucanase foi 11 vezes maior após o tratamento de plantas com uma oligoquitosana comparadas ao controle, evidenciando a associação dessa enzima na defesa de tabaco contra o TMV (YAFEI et al., 2009).

A atividade de peroxidases nas folhas de tomate foi significativamente aumentada pelo tratamento com quitosana, sobretudo aos 3 dias após a inoculação com *X. gardneri*. Essas enzimas são conhecidas por participarem de vários processos fisiológicos de grande importância, dentre eles, a deposição de compostos fenólicos e a biossíntese de lignina. A lignificação forma-se em decorrência da atividade peroxidásica que é responsável pela polimerização de unidades de fenilpropanóides para formar essa complexa estrutura. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os de Graham e Graham (1991), que encontraram boa correlação entre o aumento na atividade de peroxidases e na deposição de polímeros fenólicos em soja, induzidos por uma glucana presente na parede de *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. O aumento de peroxidases e compostos fenólicos, induzidos por uma elicítina e proteína purificada de um filtrado de *Phytophthora palmivora*, estiveram associados à resistência da seringueira *Hevea brasiliensis* contra *P. palmivora* (DUTSADEE; NUNTA, 2008). Apoiado nestes trabalhos, sugere-se que as plantas de tomates foram responsivas ao tratamento com quitosana e subsequente inoculação com *X. gardneri*. Alguns dos mecanismos que podem estar associados à interação são as atividades de peroxidases e o acúmulo de compostos fenólicos, bem como o de flavonóides.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DA BABOSA (*Aloe barbadensis* Miller) QUANTO AO EFEITO ANTIMICROBIANO E À PROTEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE CONTRA *Xanthomonas gardneri*

3.1 Introdução

A busca por alternativas aos fungicidas para o controle de doenças em plantas tem estimulado cada vez mais pesquisas envolvendo a indução de resistência. Romeiro (2008) aponta a imprescindibilidade de investigar métodos alternativos para o controle de enfermidades em plantas que sejam eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao equilíbrio dos ecossistemas. Sendo assim, encontrar uma forma mais inócua possível de ativar mecanismos de defesa em plantas, para que elas mesmas se protejam dos patógenos, por certo é uma estratégia com maiores possibilidades de aceitação pública.

Há muitos anos as plantas medicinais têm sido utilizadas popularmente. A exploração da atividade biológica de compostos presentes em tais plantas pode representar, ao lado da indução de resistência, mais uma forma de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Na literatura, encontram-se um grande número de trabalhos que utilizam as propriedades antimicrobiana e indutora de resistência de plantas medicinais. Um estudo feito por Franzener et al. (2007) mostrou que hidrolatos de *Helietta apiculata* (canela-de-veado) e *Conyza canadensis* (buva) possuem atividade antibacteriana contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e antifúngica contra *Alternaria brassicae*. Adicionalmente, foi observado um acréscimo na síntese de fitoalexinas em sorgo pelo uso desses hidrolatos. Óleos essenciais obtidos de *Origanum syriacum* var. *bevanii* (orégano), *Lavandula stoechas* subsp. *Stoechas* (lavanda), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*) apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Phytophthora infestans* do tomateiro, inibindo o crescimento *in vitro* quando incorporados em meio de cultura (SOYLU; SOYLU; KURT, 2006). Extrato aquoso de *Datura metel* apresentou efeito inibitório *in vitro* contra *Phaeoisariopsis personata* além de reduzir o desenvolvimento da doença causada pelo fungo em mais de 60% em condições de casa de vegetação (KISHORE, PANDE, RAO; 2001).

A maioria das pesquisas tem explorado a atividade dos compostos secundários presentes nos extratos ou óleos essenciais de plantas medicinais. A babosa (*Aloe barbadensis* Miller) é uma das

plantas amplamente utilizadas para fins medicinais e cosméticos e constitui uma fonte de metabólitos secundários e de polissacarídeos. Aproximadamente, 80 componentes potencialmente ativos são encontrados na babosa, incluindo vitaminas, enzimas, minerais, açúcares, lignina, saponinas, aminoácidos, ácido salicílico, dentre outros, com atividades antioxidante, antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana (SURJUSHE; VASANI; SAPLE, 2008).

A atividade antimicrobiana da babosa tem sido testada contra patógenos humanos (FUJITA et al., 1978), entretanto, pouco se sabe sobre seu efeito em fitopatógenos que acometem culturas de grande importância agrônômica. A atividade antifúngica sobre *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum coccodes*, isolados de batata, foi avaliada pelo uso de frações líquidas da babosa, ricas em fenólicos. Houve um efeito inibitório sobre os três fungos testados e, segundo os autores, esse foi o primeiro relato da atividade de frações líquidas da babosa sobre fungos fitopatogênicos (JASSO DE RODRÍGUEZ et al., 2005). Além da fração líquida oriunda das folhas da babosa, uma polpa mucilaginosa pode ser obtida a partir do tecido parenquimático. Essa polpa é rica em carboidratos e outros componentes orgânicos e inorgânicos e é usada no tratamento de pele, queimaduras cutâneas, feridas e doenças (ROVATTI; BRENNAN, 1959). A atividade antifúngica dessa polpa foi obtida por Saks e Barkai-Golan (1995) quando a testaram contra os patógenos de pós-colheita *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*. Foi observada inibição da germinação de conídios e crescimento micelial *in vitro* e uma redução significativa da incidência dessas patógenos sobre frutos de toranja tratadas com o extrato.

O objetivo desse trabalho foi (1) avaliar o efeito *in vitro* da fração polissacarídica obtida de folhas da *A. barbadensis* (FPA) sobre *Xanthomonas gardneri* e (2) verificar a atuação da FPA no controle da mancha bacteriana do tomateiro.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material vegetal e multiplicação dos patógenos

Sementes de tomate da cv. Santa Cruz Kada, suscetível a *Xanthomonas* spp., foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Germina Planta. Aos 15 dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para vasos com 2 L de capacidade, contendo composto orgânico e terra (1:5, v/v). Os experimentos foram conduzidos

em casa-de-vegetação com temperatura média de $28,3 \pm 4,6$ °C (Mínima $16,5 \pm 5,3$ e Máxima $32,7 \pm 4,1$ °C) e as plantas foram utilizadas quando apresentavam cinco folhas.

A bactéria *Xanthomonas gardneri* foi mantida a 25 °C em tampão fosfato (8,6mM K_2MPO_4 ; 7,4mN KH_2PO_4) e, quando necessária para os experimentos, foi repicada em meio nutriente-ágar (NA) e as placas incubadas a 25 °C.

3.2.2 Obtenção da Fração Polissacarídica de *A. barbadensis* (FPA)

Folhas de babosa, adquiridas a partir de uma lavoura pertencente à empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil® (Paulo Lopes, SC), foram lavadas, suas extremidades basal (~ 1cm) e apical (~ 10cm) foram removidas e a epiderme foi cuidadosamente retirada, expondo-se o parênquima de reserva. A obtenção da FPA foi feita segundo Femenia et al (2003), com adaptações. O parênquima foi triturado em aparelho multimixer (Walita® - modelo RI 1765 Philips) e peneirado para a remoção do material fibroso. Ao volume final resultante, foram adicionados 6 volumes de etanol 92° GL e a mistura foi mantida a 4 °C por 1 hora para a floculação da FPA. Após esse tempo, a FPA foi filtrada sob vácuo, em filtro Qualy® ($\varnothing = 9,0$ cm), seca em estufa a 50 °C até peso constante e, posteriormente, liofilizada. Para o uso nos experimentos, o material obtido foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó.

3.2.3 Atividade antibacteriana *in vitro* da fração polissacarídica de *A. barbadensis*

A FPA foi dissolvida em ácido clorídrico (HCl) 0,05 N e o pH ajustado para 5,6 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. Após autoclavagem a 120 °C por 20 minutos, a FPA foi adicionada ao meio NA e a mistura foi vertida em placas de Petri. A preparação foi feita de tal forma que as concentrações finais da FPA fossem de 1,5; 3,0 e 4 mg/mL. Após a solidificação do meio, alíquotas de 200 μ L de uma suspensão de *X. gardneri* (10^8 ufc/mL) foram pipetadas sobre a superfície e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Como controle, foi utilizado HCl 0,05 N (pH 5,6) incorporado em meio nutriente ágar. As placas foram incubadas a 25° C por 48 h e a avaliação realizada por meio da obtenção de uma suspensão bacteriana em 80 mL

de água destilada e leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições/tratamento, e cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

3.2.4 Aplicação dos tratamentos nas plantas, inoculação e avaliação da doença

Em experimentos independentes, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações da FPA sobre a severidade da mancha bacteriana. Foram três experimentos realizados com concentrações de 0; 0,75; 1,5; 3,0 e 6 mg/mL. O HCl 0,05 N (pH 5,6), empregado na dissolução da FPA, foi utilizado como controle negativo (0 mg/mL), e o acibenzolar-S-metil (ASM) a 50mg/L, produto registrado para a cultura do tomate contra mancha bacteriana, representou o controle positivo. As plantas foram aspergidas com os tratamentos, utilizando-se um volume de 7 mL de cada tratamento por planta, aplicados em todas as folhas. Após 3 dias, foi feita a inoculação com *Xanthomonas gardneri* (10^8 ufc/mL) com um pulverizador manual, aspergindo-se a suspensão bacteriana nas superfícies abaxial e adaxial das folhas até o ponto de escorrimento, com a manutenção das plantas em câmara úmida por 48h.

Todos os experimentos foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado com quatro ou cinco repetições/tratamento, a depender do experimento, onde a parcela experimental foi representada por um vaso contendo duas plantas. A severidade da doença (%) foi estimada visualmente 15 dias após a inoculação, avaliando-se seis folhas/repetição.

3.2.5 Varredura espectrofotométrica de plantas de tomate tratadas com FPA

Plantas de tomate com cinco folhas totalmente expandidas foram tratadas com 7 mL da FPA a 3 mg/mL e após 1, 3, 4 e 6 dias foram coletadas amostras. A inoculação com *X. gardneri* (10^8 ufc/mL) foi feita 3 dias após os tratamentos e as plantas mantidas em câmara úmida por 48h. O HCl 0,05 N (pH 5,6) foi utilizado como controle negativo e o ASM (50 mg/L) como positivo. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições/tratamento, onde a parcela experimental foi representada por um vaso contendo duas plantas.

Amostras constituídas de cinco folíolos (~500 mg de massa fresca) foram coletadas e imediatamente colocadas em 10 mL de etanol-tolueno (1:1, v/v). O tecido foi homogeneizado em almofariz durante 3 min e o extrato resultante ficou em repouso por 15 min. Após esse tempo, o extrato foi filtrado em papel filtro Qualy® ($\varnothing = 9,0$ cm) sob vácuo, depositado em frasco âmbar e realizou-se uma troca de atmosfera com nitrogênio gasoso. Os frascos foram armazenados a -20 °C até o uso. Os extratos foram diluídos em etanol-tolueno na proporção de 1:5 e submetidos à varredura espectrofotométrica (U-1800 spectrophotometer), com leitura da absorbância de 200 a 750 nm, utilizando-se o software Hitachi IV Solutions Application.

3.2.6 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA *one way*) e os testes de comparação de médias (Tukey e Dunnett) foram realizados para verificar a diferença entre as variáveis analisadas nos experimentos. As análises foram conduzidas utilizando os softwares estatísticos Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007) e Sisvar (FERREIRA, 2003).

3.3 Resultados

3.3.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Xanthomonas gardneri*

Não houve um efeito inibitório do polissacarídeo nas concentrações de 1,5 e 3 mg/mL sobre a bactéria, enquanto que 4 mg/mL estimulou o crescimento bacteriano (Figura 15).

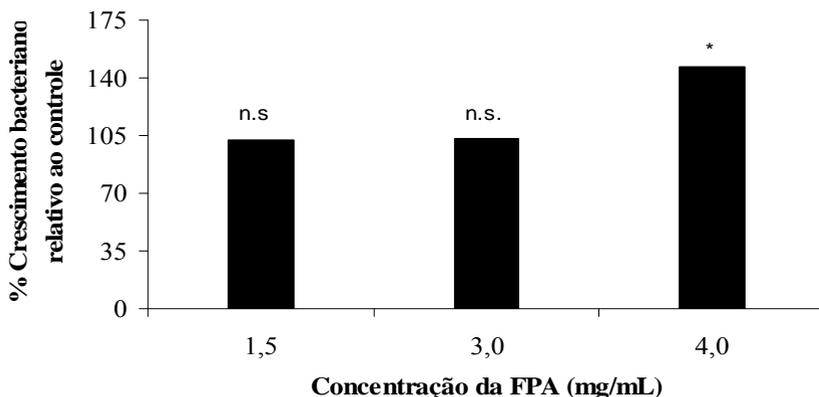


Figura 15 - Crescimento de *Xanthomonas gardneri* em meio NA acrescido de fração polissacarídica da babosa (FPA) a 1,5; 3 e 4 mg/mL em relação ao controle (NA acrescido de HCl 0,05 N).

n.s. = não significativo em relação ao controle

* = diferença significativa pelo teste Dunnett.

3.3.2 Efeito da pulverização foliar da FPA sobre a severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate

Foram realizados três experimentos independentes para avaliar o efeito da FPA sobre a mancha bacteriana. Em nenhum dos experimentos foi observado efeito fitotóxico da FPA sobre o tomateiro. O tratamento de plantas com a FPA a 1,5 mg/mL promoveu um controle da doença de 68% quando o polissacarídeo foi aplicado aos 3 dias antes da inoculação, em um dos três experimentos em que essa concentração foi testada (Tabela 3). Nos outros, a redução da severidade foi de 46 e 23%, mas sem apresentar diferença significativa em relação ao controle, pelo teste de Dunnett. O ASM promoveu o controle da mancha bacteriana em dois dos três experimentos em que foi testado. Concentrações maiores da FPA não reduziram a severidade da doença quando comparadas ao controle (HCl 0,05 N).

Tabela 3 - Proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana pela fração polissacarídica de *Aloe barbadensis*. Os dados se referem ao percentual de redução da severidade da doença em relação ao controle.

Concentração (mg/mL) ^[1]	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Proteção média ^[2]
0,75	n.t.	43% n.s.	n.t.	43%
1,5	68% *	46% n.s.	23% n.s.	46%
3,0	n.t.	9% n.s.	19% n.s.	14%
6,0	n.t.	n.t.	15% n.s.	15%
ASM ³	68% *	66% *	37% n.s.	57%

^[1] Diferentes concentrações da fração polissacarídica de *A. barbadensis*, aplicadas em plantas de tomate 3 dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri* (10^8 ufc/mL).

^[2] Proteção média conferida por FPA em três experimentos independentes com avaliação da severidade da doença feita 15 dias após a inoculação.

³ ASM = Acibenzolar-S-metil utilizado a 50 mg/L.

n.t. = não testado

n.s. = não significativo em relação ao controle

* = diferença significativa pelo teste Dunnett em relação ao controle: HCl 0,05 N (pH 5,6).

3.3.3 Perfil espectrofotométrico de plantas tratadas com FPA

Na Figura 16, observa-se que no tempo 1 (T1), os tratamentos HCl, FPA e ASM promoveram aumento considerável nos valores de absorbância (280-680 nm) comparado com plantas não tratadas (T0). Além disso, aos 4 dias após os tratamentos (T4), o pico entre 280-300 nm mostra diferença significativa entre plantas tratadas com ASM e HCl 0,05 N, ambas inoculadas com *X. gardneri* (Tabela 4). Nos comprimentos de onda entre 420-455 nm, o tratamento com FPA seguida da inoculação com *X. gardneri* (FPA T4 Xg) promoveu aumento significativo da absorbância comparado ao controle (HCl T4 Xg).

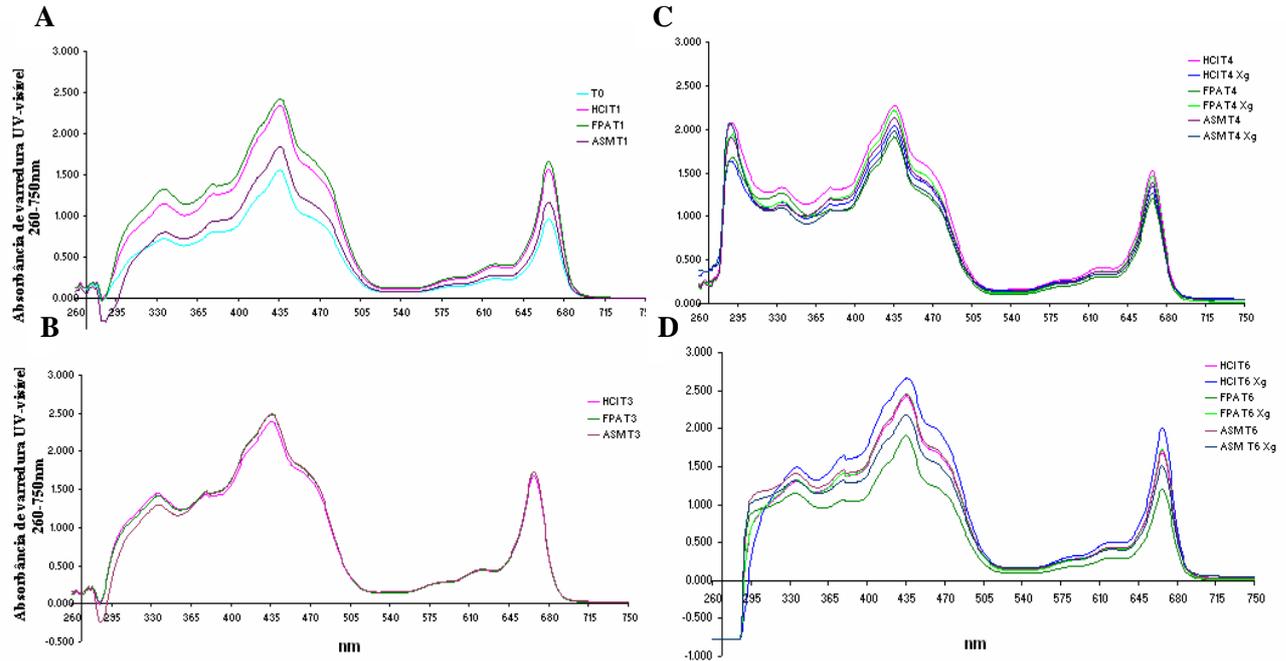


Figura 16 - Perfil espectrofotométrico do extrato etanol-tolueno de plantas de tomate tratadas com fração polissacarídica da babosa (FPA, 3 mg/mL), Acibenzolar-S-metil e HCl 0,05 N (pH 5,6), inoculadas ou não com *X. gardneri* (Xg; 10^8 ufc/mL), aos 1 (A), 3 (B), 4 (C) e 6 (D) dias após os tratamentos. T0 = testemunha absoluta.

Tabela 4 – valores médios de absorvância em plantas tratadas com a fração polissacarídica da babosa (FPA, 3 mg/mL), e inoculadas (+) ou não (-) com *Xanthomonas gardneri*, em duas faixas de comprimentos de ondas oriundas da varredura espectrofotométrica.

Tratamento	Absorvância aos 4 dias após o tratamento			
	280-300 nm		420-455 nm	
	Plantas (-)	Plantas (+)	Plantas (-)	Plantas (+)
HCl 0,05N	1,808 aA ^[1]	1,444 aB	2,025 aA	1,758 aB
FPA	1,491 bA	1,677 aA	1,659 bA	1,929 bB
ASM	1,634 aA	1,746 bA	1,858 bA	1,710 aA

^[1] Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

(+) inoculação realizada no terceiro dia após o tratamento.

3.4 Discussão

A atividade de plantas medicinais na interação planta-patógeno é muito bem relatada. Os compostos secundários dessas plantas desempenham função antimicrobiana direta ou na proteção de plantas contra patógenos (BONALDO et al., 2004).

No presente estudo, observou-se que a média de proteção conferida pela fração polissacarídica da babosa foi de 46% em relação ao HCl 0,05 N, quando utilizada a 1,5 mg/ml. Comparada ao ASM, a FPA atingiu 81% do efeito promovido pelo ativador de plantas, o qual reduziu a severidade da doença na maioria dos experimentos realizados.

A redução da doença promovida pelas substâncias testadas pode estar associada a um estímulo na biossíntese de compostos de defesa da planta. O perfil espectrofotométrico mostrou um aumento significativo da absorvância entre 280-300 nm, causada pelo tratamento com ASM+Xg, 4 dias após o tratamento. Em plantas tratadas com FPA e inoculadas com a bactéria (FPA+Xg), foi observado um aumento da absorvância entre os comprimentos de onda de 420-455 nm no T4. Essas observações indicam que a FPA e ASM podem ter condicionado as plantas a sintetizarem metabólitos em resposta à fitobactéria. Diferentes compostos absorvem a luz na faixa de comprimento de onda de 280 a 300 nm, dentre eles os fenólicos, importantes na formação da parede celular e lignificação das plantas, além de apresentarem efeitos tóxicos sobre patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Por ser um patógeno foliar, *X. gardneri* pode reduzir a taxa fotossintética das folhas infectadas por afetar diretamente os cloroplastos ou clorofilas. Entretanto, plantas de tomate tratadas com FPA apresentaram um aumento na absorvância em comprimentos de onda de 420-455 nm, o que pode ter implicado num aumento da biossíntese de compostos como os carotenóides, que podem absorver de 380 até 500 nm (MILLER, E.S., 1934). Esses pigmentos podem proteger as células vegetais contra espécies reativas de oxigênio induzidas em respostas à presença de patógenos. Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade de polissacarídeos em aumentar os pigmentos fotossintéticos (clorofila a, clorofila b e carotenóides) e conseqüentemente a produção da planta (EL-TANTAWY, 2009; CHIBU, SHIBAYAMA, 1999).

Os resultados mostram uma necessidade de estudos adicionais para determinar possíveis metabólitos ou enzimas induzidas por ASM e FPA. Os picos entre 645-680 nm, observados em todos os espectros, são típicos de absorção por clorofilas.

Embora um efeito eliciador e antifúngico tenham sido relatados com outras plantas medicinais, inclusive com extratos de babosa (FRANZENER et al., 2007; SOYLU; SOYLU; KURT, 2006; JASSO DE RODRÍGUEZ et al., 2005; BONALDO et al., 2004; KISHORE, PANDE, RAO; 2001; SAKS; BARKAI-GOLAN, 1995) a fração polissacarídica da *A. barbadensis* não mostrou atividade inibitória sobre a bactéria *X. gardneri*. Ao contrário, notou-se até um aumento no crescimento bacteriano quando a FPA foi utilizada a 4 mg/mL.

Por ser tratar de um resíduo insolúvel em água, a FPA obtida da polpa das folhas de babosa foi dissolvida em HCl 0,05 N, conforme metodologia empregada na dissolução de outros polissacarídeos (BEN-SHALOM et al., 2003). Como para os testes *in vitro* a esterilização da FPA foi feita por meio de autoclavagem (120 °C por 20 min), o aquecimento associado à acidificação pode ter causado ruptura de ligações que unem os monômeros dos carboidratos e conseqüente liberação desses ao meio de cultivo em que foram preparados os testes. Dentre os polissacarídeos presentes na *A. barbadensis*, a acemanana é considerada a principal substância ativa (MCANALLEY, 1993). É um polímero formado por unidades de glucose e manose acetiladas unidas por ligação do tipo β (1 \rightarrow 4). Os monômeros supostamente liberados no meio de cultivo podem ter servido de nutrientes para a fitobactéria, o que favoreceu a multiplicação de células bacterianas. Acredita-se que a adoção de uma estratégia para melhor dissolução e esterilização da FPA possam modificar o seu perfil de atuação nos testes *in vitro*, já que Saks

e Barkai-Golan (1995) mostraram uma atividade antimicrobiana para diferentes fungos com a utilização da polpa da *A. babadensis*, que é rica em polissacarídeos.

CAPÍTULO 4 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA E SEU EFEITO NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE CONTRA *Alternaria solani*

4.1 Introdução

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) assume grande importância econômica mundial com uma produção em torno de 126 milhões de toneladas anual. No Brasil, 9º maior produtor de tomate do mundo, a produção atingiu mais de 3,4 milhões de toneladas (FAO, 2007). Entretanto, um dos fatores limitantes que ameaçam a produtividade dos cultivos são as doenças. Dentre aquelas que acometem o tomateiro, encontra-se a pinta-preta causada por *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout. O fungo causa grandes prejuízos econômicos no Brasil e ocorre em praticamente todas as regiões em que o tomateiro é cultivado, provocando perdas pela infecção dos frutos e por reduzir o vigor da planta decorrente da desfolha. As condições favoráveis para o desencadeamento da doença são a alta umidade relativa do ar e temperaturas entre 25 e 30 °C. (TÖFOLI; DOMINGUES, 2005).

O controle dessa doença é baseado, principalmente, em aplicações sistemáticas de fungicidas, porém não têm sido efetivos (PAUL et al., 2004). Também não se conhecem cultivares comerciais com alto nível de resistência à pinta preta. Outro problema prático é o fato da doença ocorrer, principalmente, no período de frutificação, o que inviabiliza a aplicação destes produtos químicos, que são nocivos à saúde humana (RAO et al., 2008).

Atualmente, há um interesse crescente na busca por substâncias bioativas para o controle de doenças em plantas. Diversos pesquisadores têm se dedicado a estudos para encontrar compostos menos agressivos ao ambiente e com capacidade de ativar mecanismos de defesa em plantas, dentro da perspectiva de indução de resistência. O potencial dos indutores de resistência além de chamar a atenção da comunidade acadêmica, representa um interesse para a área comercial, pois diversos produtos já se encontram registrados no mundo com capacidade eliciadora (LABANCA, 2002). Dentre estes, o Bion® (Acibenzolar-S-metil - ASM) está disponível comercialmente no Brasil e é registrado para a cultura do tomate no controle de doenças fúngicas e bacterianas (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda).

Outros compostos vêm sendo pesquisados como potenciais eliciadores de respostas de defesa das plantas, dentre eles encontra-se a

quitosana. Este polissacarídeo linear é formado por unidades de glucosamina e *N*-acetilglucosamina e pode ser extraído do exoesqueleto de crustáceos pela desacetilação alcalina da quitina ou da parede celular de alguns fungos (MAJETI; KUMAR, 2000). A quitosana é uma alternativa promissora por possuir atividade antimicrobiana e atuar na indução de mecanismos de defesa nos tecidos das plantas (EL GHAOUTH et al., 1992; HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008).

Estudos mostraram o efeito antifúngico da quitosana sobre *Botrytis cinerea* que acomete pepino, morango e tomate (BEN-SHALOM et al., 2003; EL GHAOUTH et al., 1992; LIU et al., 2007). Da mesma forma, para espécies de *Fusarium*, o polissacarídeo afetou o crescimento micelial e a germinação de conídios (HADWIGER; BECKMAN, 1980). El Ghaouth et al. (1992) observaram que a quitosana causou alterações morfológicas nas hifas de *Rhizopus stolonifer* as quais apresentaram excessivas ramificações.

A pulverização da quitosana em plantas induz várias respostas de defesa, incluindo o aumento na atividade de β -1,3-glucanases (DI PIERO; GARDA, 2008), fenilalanina amônia-liase (ROMANAZZI, et al., 2002), compostos fenólicos (BHASKARA REDDY et al., 1999) e fitoalexinas (HADWIGER; BACKMAN, 1980). Entretanto, são poucos os relatos sobre indução de resistência por quitosana, ou seu efeito inibitório contra patógenos fúngicos do tomateiro (BADAWY; RABEA, 2008; LIU et al., 2007). Recentemente, Amini (2009) observou que o tratamento combinado da quitosana com uma raça não patogênica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* promoveu uma redução significativa da murcha de fusário de até 65,7%.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da quitosana com diferentes pesos moleculares quanto à atividade antifúngica sobre *A. solani* e no controle da pinta preta em tomateiro.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de tomate da cv. Santa Cruz Kada, suscetível a *Alternaria solani*, foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Germina Planta. Aos 15 dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para vasos com 2 L de capacidade, contendo composto orgânico e terra (1:5, v/v). Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação com temperatura média de $28,3 \pm 4,6$ °C (Mínima

16,5 ± 5,3 e Máxima 32,7 ± 4,1 °C) e as plantas foram utilizadas quando apresentavam cinco folhas

4.2.2 Obtenção, multiplicação e esporulação de *Alternaria solani*

Um isolado de *A. solani*, obtido de folhas sintomáticas de tomateiro, foi gentilmente cedido pelo Prof. José Renato Stangarlin da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE). O fungo foi preservado em água destilada estéril e recuperado a partir de repiques em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Himedia, Mumbai, Índia) as quais foram incubadas em câmara tipo BOD a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h na luz e 12 h no escuro.

Para induzir o fungo à esporulação, discos contendo micélio de *A. solani*, retirados de colônias com 8 dias de crescimento em meio BDA, foram transferidos para placas contendo meio V8-ágar [(15 g de ágar; 3 g de carbonato de cálcio; 200 mL de suco V8® da Campbell Soup Company, completando-se o volume para 1000 mL com água destilada (Miller, 1995)], as quais foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Quando a colônia fúngica atingiu $\frac{3}{4}$ da placa, foram feitas raspagens do micélio aéreo com auxílio de uma lâmina de vidro e água destilada estéreis e as placas foram cobertas com filme plástico perfurado e incubadas. Após 5 dias, uma suspensão de esporos foi obtida em 10 mL de água destilada e ajustada para 10^3 ou 10^4 conídios/mL com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico. Para a aplicação sobre as plantas, adicionou-se Tween-20 0,01% (v/v) à suspensão de conídios.

4.2.3 Preparo das quitosanas utilizadas no estudo

Foram utilizados três tipos de quitosana: quitosana de baixo (Qbpm; 50-190 KDa) e médio peso molecular (Qmpm; 190-310 KDa) (Sigma Aldrich Chemicals, SP/Brasil) com 75-85% de desacetilação e uma quitosana comercial (Qcom) com 85% de desacetilação, gentilmente cedida pelo professor Dr. Luis Beirão, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (CAA/UFSC). O polissacarídeo ficou sob agitação em vórtex até completa dissolução (BHASKARA REDDY et al., 1999).

4.2.4 Atividade antifúngica da quitosana *in vitro* sobre *Alternaria solani*

Para o efeito das quitosanas Qbpm, Qmpm e Qcom sobre o crescimento micelial, os polissacarídeos foram preparados conforme item 3.2.3 e, separadamente, foi preparado o meio BDA (39 g/L). Todo o material foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos e, logo após, cada quitosana foi adicionada ao meio BDA, sendo a mistura (~ 20 mL/placa) vertida em placas de Petri. A preparação foi feita de tal forma que as concentrações das quitosanas no meio fossem de 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL. Após a solidificação do meio, um disco de micélio de 7 mm de diâmetro foi retirado da borda de colônias cultivadas em meio BDA e repicado para o centro de cada placa de Petri. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 25 °C, com 12 horas diárias de luz. O crescimento micelial foi verificado diariamente, por meio de medições do diâmetro das colônias em dois eixos perpendiculares entre si pré-estabelecidos na primeira avaliação através de uma marcação no fundo da placas. A avaliação foi feita até que o micélio de um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Posteriormente, foi calculado o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) (OLIVEIRA, 1991): $IVCM = S(D-D_a)/N$, em que: IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial, D = diâmetro médio atual, D_a = diâmetro médio anterior e N = número de dias após a repicagem.

O efeito das quitosanas sobre a germinação de conídios foi avaliado através da deposição de alíquotas de 30 µL da suspensão de Qcom, Qbpm ou Qmpm, nas mesmas concentrações descritas acima, sobre 30 µL de suspensão de conídios de *A. solani* (10^5 conídios/mL) previamente depositados nas cavidades de lâminas escavadas. Após 24h de incubação a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h na luz e 12 h no escuro, foram adicionados 30 µL de lactofenol em todas as lâminas, para paralisar o crescimento do tubo germinativo. Em seguida, procedeu-se a avaliação através da porcentagem de germinação de conídios. O conídio foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo foi maior ou igual ao menor diâmetro do conídio. Foram contados 400 conídios/tratamento e o comprimento do tubo germinativo foi mensurado em 120 esporos por tratamento com auxílio de uma ocular micrométrica e microscópio óptico.

Para os testes *in vitro* com *A. solani*, foi adotado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5, sendo três tipos de quitosana e cinco concentrações das mesmas. Realizaram-se quatro

repetições por tratamento, com uma repetição representada por uma placa ou lâmina.

4.2.5 Aplicação dos tratamentos nas plantas, inoculação e avaliação da doença

Para avaliar o efeito das quitosanas sobre a severidade da pinta preta, procedeu-se a aplicação de Qbpm, Qmpm e Qcom nas concentrações de 1,5; 3 e 6 mg/mL. Foram utilizados como controles o HCl 0,05 N (pH 5,6), empregado na dissolução da quitosana e o acibenzolar-S-metil (ASM) a 50 mg/L, produto registrado para a cultura do tomate contra pinta preta. As plantas foram tratadas quando apresentavam cinco folhas, com 7 mL de cada tratamento/planta, os quais foram aspergidos em todas as folhas. Após 2 dias, foi feita a inoculação com *A. solani* (10^4 conídios/mL) através de um pulverizador manual, aspergindo-se a suspensão nas superfícies abaxial e adaxial das folhas até o ponto de escorrimento, com a manutenção das plantas em câmara úmida por 48h.

Um experimento posterior foi realizado com intervalos maiores entre a aplicação dos tratamentos e a inoculação, e uma concentração menor do inóculo de *A. solani*. Para tanto, utilizou-se a Qbpm nas concentrações de 1,5 e 3 mg/mL, com pulverizações feitas 3 ou 5 dias antes da inoculação com o fungo (10^3 conídios/mL). As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h.

Os experimentos foram montados sob delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições/tratamento, onde a parcela experimental foi representada por um vaso contendo duas plantas. A severidade da doença (%) foi estimada visualmente 10 dias após a inoculação, avaliando-se seis folhas/repetição.

4.2.6 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA *one way* ou fatorial) e o teste de Tukey (comparações múltiplas) foram realizados para verificar a diferença entre as médias das variáveis analisadas nos experimentos. As análises foram conduzidas utilizando os softwares estatísticos Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007) e Sisvar (FERREIRA, 2003).

4.3 Resultados

4.3.1 Atividade antifúngica

Os experimentos *in vitro* foram realizados em duplicata, e como os resultados obtidos foram semelhantes, apenas um deles será apresentado.

A incorporação das quitosanas ao meio de cultura alterou o IVCM de *A. solani* de forma linear, pois quanto maior a concentração, menor foi o crescimento micelial. Houve uma inibição máxima de aproximadamente 60 % do crescimento micelial quando utilizadas a 1 mg/mL, comparado ao controle (Figura 17e 18).

A avaliação do efeito das quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm sobre *A. solani* mostrou que não houve diferença entre os polissacarídeos. A menor concentração testada de quitosana (0,125 mg/mL), propiciou uma redução de 85% sobre a germinação de conídios e 70% sobre o comprimento do tubo germinativo de *A. solani*, comparadas ao controle (HCl 0,05 N) (Tabela 5). Concentrações maiores não promoveram aumento na atividade antifúngica das quitosanas.

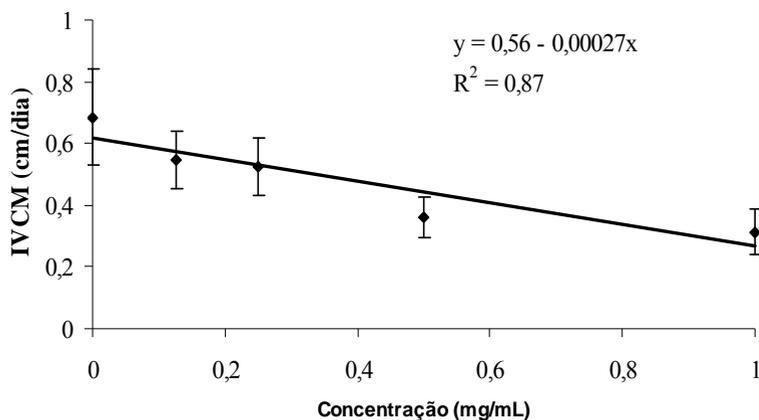


Figura 17 - Efeito de diferentes concentrações das quitosanas comercial, de baixo e médio peso molecular a 0,125; 0,250; 0,5 e 1 mg/mL sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani*. Linhas verticais no gráfico representam o desvio-padrão. Houve efeito de concentração das quitosanas sobre a germinação do fungo pelo teste F a 5%.

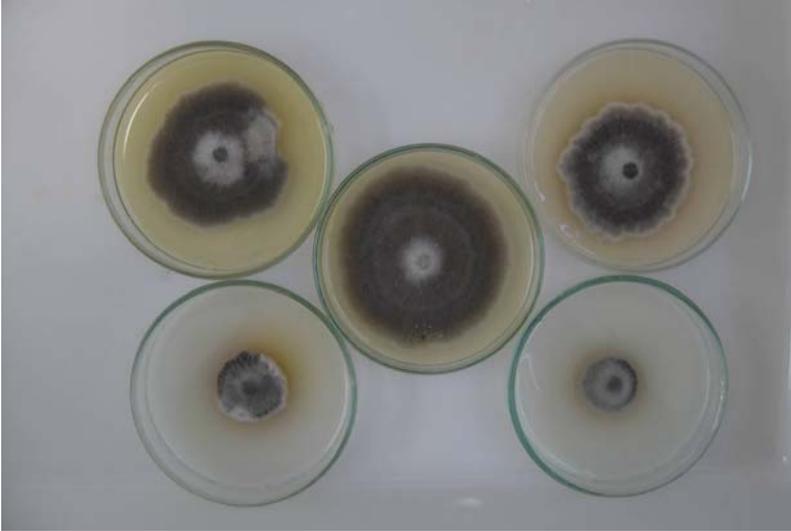


Figura 18 - Crescimento micelial de *Alternaria solani* em meio BDA acrescido de quitosanas com diferentes concentrações. Como as quitosanas apresentaram efeito similar sobre o crescimento micelial, escolheu-se apenas uma figura para ilustrar o padrão do crescimento, neste caso, meio BDA com quitosana de baixo peso molecular (Qbpm).

Tabela 5 – Atividade antifúngica das quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm sobre a germinação de conídios e alongamento do tubo germinativo de *Alternaria solani*.

Tratamento (mg/mL)	Germinação de conídios (%)	Tubo germinativo (μ m)
HCl 0,05 N	93,8 \pm 2,7 ^[1]	145 \pm 31 ^[2]
<i>Qcom</i> (mg/mL)		
0,125	14,5 \pm 3,7	41,9 \pm 6,5
0,250	11,3 \pm 0,6	42,8 \pm 3,7
0,500	13,0 \pm 2,9	47,6 \pm 7,9
1,000	11,5 \pm 1,7	41,3 \pm 6,3
<i>Qbpm</i> (mg/mL)		
0,125	13,8 \pm 2,2	40,5 \pm 6,0
0,250	14,5 \pm 4,7	43,2 \pm 3,6
0,500	14,5 \pm 6,5	38,6 \pm 4,5
1,000	11,0 \pm 3,7	38,5 \pm 5,4
<i>Qmpm</i> (mg/mL)		
0,125	10,5 \pm 1,3	43,7 \pm 10,9
0,250	14,0 \pm 1,4	46,8 \pm 5,0
0,500	10,0 \pm 2,0	47,5 \pm 7,5
1,000	14,5 \pm 4,7	43,3 \pm 6,5

^[1,2] Resultados representam a média \pm desvio padrão da germinação de conídios e do crescimento do tubo germinativo de *A. solani*, respectivamente. Houve diferença significativa entre o HCl 0,05 N e as quitosanas pelo teste F a 5% de significância, nas duas variáveis mensuradas, entretanto não houve diferença entre quitosanas.

4.3.2 Comportamento de plantas de tomate após aplicação de quitosana e desafio com *Alternaria solani*

Foi avaliado o efeito das quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm sobre a pinta preta do tomateiro em dois experimentos. Para ambos, nenhuma das quitosanas foram fitotóxicas às plantas pulverizadas.

Inicialmente, os tratamentos foram testados nas concentrações de 1,5; 3 e 6 mg/mL, aplicados 2 dias antes da inoculação com *A. solani* (10^4 conídios/mL). A ANOVA fatorial mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos e nem efeito de concentrações da

quitosana sobre a doença. O ASM também não foi eficiente no controle da doença (Figura 19).

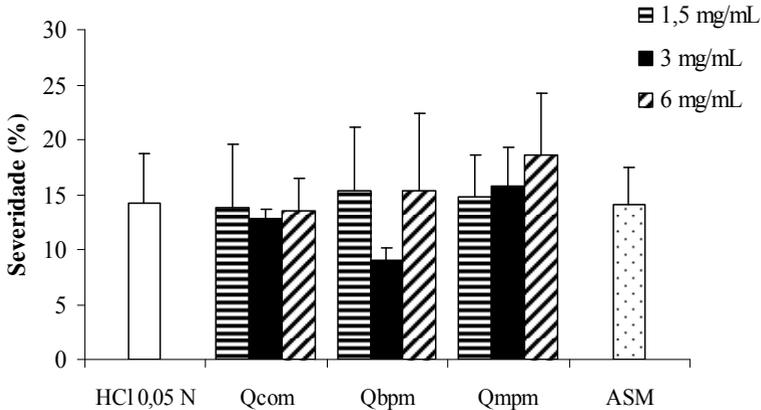


Figura 19 - Efeito da quitosana comercial (Qcom), de baixo peso molecular (Qbpm) e de médio peso molecular (Qmpm), em diferentes concentrações, sobre a pinta preta. A inoculação foi feita com *Alternaria solani* (10^4 conídios/mL) 2 dias após a realização dos tratamentos. Não houve efeito de tratamentos ou de concentrações pelo ANOVA fatorial.

Por se tratar de um isolado agressivo, procedeu-se outro experimento, reduzindo a concentração do inóculo de *A. solani* para 10^3 conídios/mL. Além disso, foi aumentado o intervalo entre a pulverização dos tratamentos de 2 dias para 3 e 5 dias antes da inoculação. A quitosana de baixo peso molecular (Qbpm) foi escolhida nesse experimento por ter apresentado uma menor severidade da doença a 3 mg/mL no experimento anterior. Entretanto, não houve diferença entre a Qbpm nas concentrações de 1,5 e 3 mg/mL nos dois intervalos adotados. O ASM foi aplicado aos 5 dias antes da inoculação e também não reduziu a doença comparado ao controle (Figura 20).

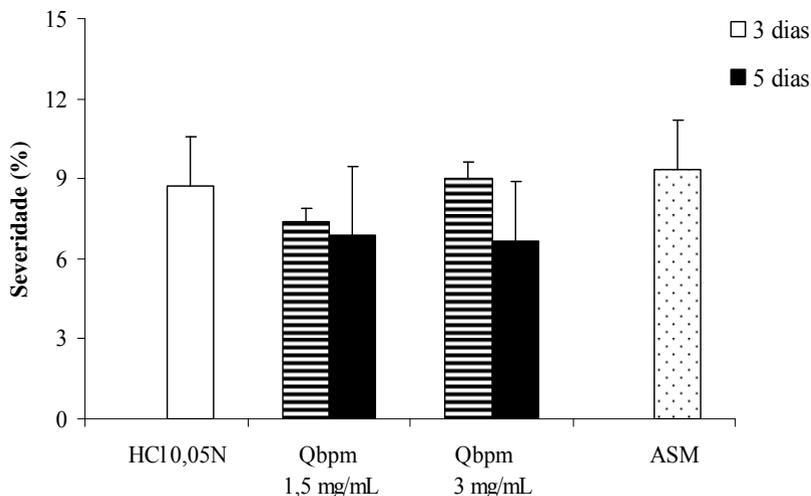


Figura 20 - Efeito da quitosana de baixo peso molecular (Qbpm), a 1,5 e 3 mg/mL, sobre a pinta preta, com inoculação de *Alternaria solani* (1×10^3 conídios/mL) feita 3 ou 5 dias após o tratamento. O HCl e ASM foram pulverizados 5 dias antes da inoculação com o fungo. Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste F a 5% de significância.

4.4 Discussão

A quitosana é um biopolímero que tem demonstrado potencial no controle de diversas doenças de origem fúngica (RODRIGUES; BEZERRA-NETO; COELHO, 2006; DI PIERO; GARDA, 2008; BEN-SHALOM et al., 2003; CIA, 2005; ROMANAZZI et al., 2002). Entretanto, no presente estudo, as quitosanas testadas não propiciaram um controle da pinta preta quando utilizadas em concentrações de até 6 mg/ml e em intervalos de tempo entre tratamento e inoculação de até 5 dias.

O ASM, incluído como um controle positivo por se tratar de um produto registrado para o controle da pinta preta em tomateiro e do qual se esperava uma redução da doença, não se mostrou eficiente nas condições testadas. Tõfoli e Domingues (2005) avaliaram o desempenho do ASM para o controle da pinta preta em tomateiro com aplicações do produto em intervalos de 7 a 10 dias, num total de 5 aplicações e com isso obtiveram efeitos positivos no controle da doença. Cavalcanti e

Resende (2004) compararam diferentes épocas de aplicação do ASM (3, 7 e 15 dias antes da inoculação com *Verticillium dahliae*) em plantas de cacau e observaram que um intervalo de 15 dias promoveu melhor redução da severidade da murcha causada pelo fungo. Como nos experimentos realizados foi feita apenas uma aplicação do ASM e em intervalo de no máximo 5 dias, pode-se inferir que talvez sejam necessários intervalos maiores entre a sua aplicação e inoculação com o *A. solani*, e mais de uma aplicação para que o produto possa expressar o seu potencial.

A falta de controle da pinta preta no tratamento com ASM pode indicar que as condições ambientais não estavam propícias para ocorrer a ativação de mecanismos de defesa na planta, já que esse produto é classificado como um Ativador de Plantas junto ao Ministério da Agricultura e registrado para o controle dessa doença. Isso pode ter contribuído para a ausência de efeito protetor pela quitosana.

Por outro lado, a quitosana poderia proteger as plantas atuando diretamente sobre o agente causal. Pelos estudos *in vitro*, observa-se que as quitosanas inibiram a germinação de conídios e o crescimento micelial de *A. solani*. A quitosana é bem conhecida por interferir com o crescimento de vários fungos fitopatogênicos incluindo *Botrytis cinerea* (LIU et al., 2007) *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (HADWIGER; BECKMAN, 1980) e *Rhizopus stolonifer* (EL GHAOUTH et al., 1992). Os resultados da quitosana com *A. solani* mostram que embora tenha sido alta a inibição encontrada, sobretudo na germinação de conídios (85% de inibição), não foi observada uma inibição completa do desenvolvimento do fungo, indicando um efeito fugistático ao invés de fungicida. Esses resultados estão em consonância com os que foram relatados por El Ghaouth al. (1992) e Ben-Shalom (2003), que também não observaram inibições completas no desenvolvimento de *Rhizopus stolonifer* e *B. cinerea* quando a quitosana foi utilizada numa concentração máxima de 6 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente.

Pôde-se notar que não houve um efeito do peso molecular da quitosana sobre a germinação de conídios e o crescimento micelial de *A. solani*, já que não foram observadas diferenças entre as quitosanas utilizadas. Entretanto, estudos têm demonstrado que esta é uma característica que pode interferir na atividade do polissacrídeo. Hernadéz-Lauzardo et al. (2008) observaram que houve um efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *R. stolonifer* utilizando-se uma quitosana de baixo peso molecular (Qbpm) a qual também provocou alterações na morfologia dos esporos. De maneira similar, Liu et al. (2007) verificaram marcante efeito de uma Qbpm sobre o

crescimento micelial de *B. cinerea* e *P. expansum*. Entretanto, para *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* e *Valsa mali*, a inibição do crescimento fúngico ocorreu com uma quitosana de alto peso molecular (GUO et al., 2006). Embora estes trabalhos tenham demonstrado o efeito do peso molecular na atividade polissacarídica, o exato mecanismo de atuação sobre o patógeno ainda não está totalmente esclarecido.

Acredita-se que a natureza catiônica colabore para a atuação da quitosana, uma vez que suas cargas positivas podem interagir com os resíduos carregados negativamente das macromoléculas expostas na superfície da célula de patógenos, causando alteração na permeabilidade da membrana celular com extravasamento de constituintes intracelulares (BENHAMOU, 1996). As quitosanas utilizadas nesse estudo foram similares entre si quanto ao grau de desacetilação da molécula, o que pode ter contribuído para uma resposta similar das mesmas sobre o fitopatógeno.

Apesar do marcante efeito *in vitro* das quitosanas sobre *Alternaria solani*, não se demonstrou ação do polissacarídeo sobre a proteção de plantas de tomate contra o referido agente causal.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados desse estudo é possível concluir que:

- (i) a quitosana apresenta capacidade de reduzir a severidade da mancha bacteriana do tomateiro, o que pode estar associado tanto a uma atividade antimicrobiana sobre *X. gardneri* como pela indução de respostas de defesa;
- (ii) a quitosana atua na rota dos fenilpropanóides, promovendo acúmulo de compostos fenólicos em resposta à fitobactéria;
- (iii) a atividade de peroxidases, aumentada pelo tratamento com quitosana, pode contribuir para redução da mancha bacteriana;
- (iv) há uma atividade antifúngica da quitosana, evidenciada pela inibição da germinação de conídios e crescimento micelial de *A. solani*, entretanto, não há controle da pinta preta quando a quitosana é aplicada preventivamente em plantas de tomate;
- (v) a fração polissacarídica da *A. barbadensis* (FPA) apresentou controle da mancha bacteriana menos consistente em relação ao promovido pela quitosana; o modo de ação de FPA pode envolver a biossíntese de pigmentos fotossintéticos que contribuem para a proteção de plantas contra estresse oxidativo causado pela presença de patógenos.

6 REFERÊNCIAS

ABD-EL-KAREEM, F. et al. Use of chitin and chitosan against tomato root rot disease under greenhouse conditions. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v.2, n. 4, p. 147-152, 2006.

AMINI, J. Induced Resistance in Tomato Plants Against Fusarium Wilt Invoked by Nonpathogenic Fusarium, Chitosan and Bion. **The Plant Pathology Journal**. v. 25, n. 3, 256-262, 2009

AGRAWAL, G. K. et al. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 1061–1069, 2002.

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

ANFOKA, G. H. 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**, v. 19, p. 401-405, 2000.

ARCAS, M. C.; BOTÍA, J. M.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J. A. UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 617–622, 2000.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2. n. 3, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology Technology**, v. 51, n1, p. 110-117, 2008.

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de curcuma longa e curcumina - II. Avaliação in vivo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 401-404, 2006.

BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-

S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, v. 52, p. 747–753, 2003.

BELKACEMI, K.; CORCUFF, R. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 39–51, 2000.

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**, v. 204, p. 153-168, 1998.

BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 7, p. 233-240, 1996.

BENHAMOU, N.; THÉRIAULT, G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, p. 33-52, 1992.

BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, v.22, p. 285–290, 2003.

BHASKARA REDDY, M. V.; ARUL, J.; ANGERS, P.; COUTURE, L. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.1208-1216, 1999.

BHUIYAN, N. H. GOPALAN. Role of lignification in plant defense. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 2, 158-159, 2009.

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

BONALDO, S.M. SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum*

lagenarium, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 128-134, 2004.

BOVY, A.; SCHIJLEN, E.; HALL, R. D. Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. **Metabolomics**, v. 3, p. 399–412, 2007.

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

BRISSET, M. et al. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 529–536, 2000.

BUENSANTEAI, N.; YUEN, G.Y. Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 Sutruedee Prathuangwong. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 1275–1286, 2009.

CAI, K. et al. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. **Physiologia Plantarum**, v. 134, p. 324–333, 2008.

CAMPOS, A. D. et al. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.15-21, 2009.

CÂNDIDO, E. S. et al. *Xanthomonas gardneri* exoenzymatic activity towards plant tissue. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 163–170, 2008.

CAVALCANTI, F. R. et al. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicioso* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 26, p. 729–738, 2007a.

CAVALCANTI, F. R., RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, J. T. A. Peroxidases ativadas por frações protéicas de extrato biológico eficaz na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 507-511, 2007b.

CAVALCANTI, F. R. et al. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p. 1721-1730, 2006a.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de resostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 31 n. 4, p. 372-380, 2006b.

CAVALCANTI, L.S.; RESENDE, M.L.V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-Verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 67-71, 2004.

CHAERANI, R.; VOORRIPS, R. E. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. **Journal of General Plant Pathology**, v. 2, p. 335–347, 2006.

CHEN, C. et al. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 13-23, 2000.

CHIBU. H.; H. SHIBAYAMA.. Effect of chitosan application on shoot growth of several crop seedlings. **Japanense Journal Crop Science**, v. 9, p. 15-20, 1999.

CHIEN , P.; SHEU, F.; LIN, H. Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. **Food Chemistry**, v. 100, 1160–1164, 2007.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 197p – Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, SP, 2005.

CLIVE LO, S. C. NICHOLSON, R. L. Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. In: Pascholati, S.F; Leite, B;

Stangarlin, J. R.; Cia, P. **Interação Planta-Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular** (ed). Piracicaba: FEALQ, 2008.

COHEN Y. et al. β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, v. 104, p. 59–66, 1994.

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

CURSINO-SANTOS, J. R; DEFINA, T. P. A; MARTINEZ-ROSSI, N. M. **Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular**. São Paulo: RiMa, 2003.

DEL RÍO, J. A. et al. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. **Food Chemistry**, v. 83, p. 75–78, 2003.

DEL RÍO, J. A. et al. Involvement of phenolic compounds in the antifungal defense mechanisms of *Olea europaea* L. and *Citrus* sp. **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, p. 331–341, 2000.

DEVAIAH, S. P.; MAHADEVAPPA, G. H.; SHETTY, H. S.; Induction of systemic resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) against downy mildew (*Sclerospora graminicola*) by *Datura metel* extract. **Crop Protection**, v. 28, p. 783–791, 2009.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, S.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703–714, 2004.

DINIZ, L.P. et al. Avaliação de produtos alternativos para controle da queima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 171–179, 2006.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p. 1121–1128, 2008.

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

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

DUTSADEE, C.; NUNTA, C. Induction of peroxidase, scopoletin, phenolic compounds and resistance in *Hevea brasiliensis* by elicitor and a novel protein elicitor purified from *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, p. 179–187, 2008.

DUVAL, A. M. Q. **Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas a mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil.** 111f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. 2003.

EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; WILSON, C. L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19. p. 103–110, 2000.

EL GHAOUTH, A.; AHMAD, A. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reaction. **Phytopathology**, v. 84, p. 313-320, 1994.

EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v. 82, p. 398-402, 1992.

EL-TANTAWY, E.M. Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 17, p. 1164-1173, 2009.

FALCÓN, A. et al. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica*

nicotianae. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 103–112, 2008.

FAO - FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. 2007. Statistical – database. Disponível em <<http://Faostat.fao.org>>. Acesso em 09 de setembro de 2009.

FAORO, F. et al. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. **Biological Control**, v. 53, p. 387–401, 2008.

FEMENIA, A.; SÁNCHEZ, E. S.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999.

FERREIRA, D. F. **SISVAR v. 4.3** (Build 45). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil. 2003.

FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

FRIEDRICH, L. et al. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**. v. 10, n. 1, p. 61-70, 1996.

FUJITA, K. et al. Effect of leaf extracts of *Aloe arborescens* Miller spp. *Natalensis* Berger, active against the human fungal pathogen *Trichophyton mentagrophytes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, p. 132–136, 1978.

GAHLER, S.; OTTO, K.; BOHM, B. Alterations of vitamin c, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7962-7968, 2003.

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

GOY, R. C. ; ASSIS, O. B. G. ; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 29-33, 2004.

GRAHAM, M. Y; GRAHAM, T. L. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. **Plant Physiology**, v. 97, p. 1445-1455, 1991.

GURGEL, L. M. S. et al. Proteção à murcha de fusário do tomateiro com acibenzolar-S-metil e ácido â-aminobutírico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 655-657, 2005.

GUO, Z. et al. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 351–354, 2006.

HADWIGER, L. A.; BACKMAN, J. M. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. **Plant Physiology**, v. 66, p. 205-211, 1980.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance : how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

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

HEIL, M . Induced systemic resistance (ISR) against pathogens – a promising field for ecological research. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 4, n. 2, p. 65–79, 2001.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. et al. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill . **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 541–547, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2007/default.shtm>>. Acesso em 10 janeiro 2009.

JAE-YOUNG, J.; SE-KWON, K. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6629-6633, 2006.

JARUATA, M. J. O; FANTOVA, M. C. **Catálogo de semillas de tomates autóctonos: Banco de Germoplasma de Plantas Hortícolas de Zaragoza**. Diputación General de Aragón. Aragón. ES. 1999. 71 p.

JASSO DE RODRÍGUEZ, D. et al. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 81-87, 2005.

JEON, Y.; PARK, P.; KIM, S. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 71-76, 2001.

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

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

JONES, J.B. et al. Compendium of Tomato Diseases. **American Phytopathological Society** - ASP Press, 100p, 1991.

KANDAN, A. et al. Induction of phenylpropanoid metabolism by *Pseudomonas fluorescens* against *Tomato spotted wilt virus* in tomato. **Folia Microbiológica**, v. 47, n.2, p. 121-129, 2002.

KANGATHARALINGAM, N. et al. Epidermal anthocyanin production as an indicator of bacterial blight resistance in cotton. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, n. 3, p. 189-195, 2002.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; RAO, J. N. Control of late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea*) by extracts from non-host plant species. **Plant Pathology Journal**, v. 17, n. 5, p. 264-270, 2001.

KRONKA, A. Z. **Cancro bacteriano no tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle.** 79p - Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, SP, 2004.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 7-12, 2001.

KUROZAWA C; PAVAN M. A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI H. et al. (eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** São Paulo: Agronômica Ceres. p. 607-626. 2005.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum langenarium* e da síntese de glicéolinas em soja (*Glycine max*).** 107p – Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

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

LEBOEUF, J. et al. **Bacterial diseases of tomato: bacterial spot, bacterial speck, bacterial canker.** 2005. Disponível em <<http://www.omafra.gov.on.ca>> Acesso em: 09 maio 2008.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n.1, p. 273-279, 1972.

LI B. et al. Antibacterial activity of chitosan solution against Xanthomonas pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 287–292, 2008.

LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 300–306, 2007.

- LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005.
- LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Embrapa SPI, Brasília, DF, 67p. 1994.
- MAJETI N. V. KUMAR, R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1–27, 2000.
- MAKISHIMA, N.; CARRIJO, O. A. **Cultivo protegido do tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica, 13). 18 p. 1998.
- MANDAL, S.; MITRA, A.; MALLICK, N. Time course study on accumulation of cell wall-bound phenolics and activities of defense enzymes in tomato roots in relation to Fusarium wilt. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 795–802, 2009.
- MCANALLEY, B. H. Process for preparation of Aloe products. European Patent WO 89/06539. 1993.
- MCCUE, P. et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Biochemistry**, v. 35, p. 603–613, 2000.
- MILLER, E. S. Quantitative absorption spectra of the common carotenoids. **Plant Physiology**, v. 9, n. 3, p. 693–694, 1934.
- MILLER, P. M. V-8 juice agar as a general-purpose médium for fungi and bacteria. **Phytopathology**, v. 45, p. 461–462, 1955.
- NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369–389, 1992.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 111 p. – Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1991.

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

PANDEY, R.; MISHRA, A. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, online version, 2009.

PATTERSON, C. L. Importance of chlamydospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight on tomato. **Plant Disease**, v. 75, p. 274-278, 1991.

PAUL, P. A. et al. Epidemiologia comparativa da pinta preta do tomateiro sob quatro regimes de pulverização. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 475-479, 2004.

PENTEADO, S. R. **Cultivo orgânico de tomate**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2004.

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

QUEZADO-DUVAL, A. M. et al. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 695, p. 101-108, 2005.

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

RABEA, E. I. et al. In vitro assessment of N-(benzyl)chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 237–245, 2009.

RAO, E.S. et al. Genetics of rate limiting disease reaction to *Alternaria solani* in tomato. **Euphytica**, v.159, p. 123–134, 2008.

REYNOLDS, T., DWECK, A.C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3–37, 1999.

RIDE, J. P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. **Physiological Plant Pathology**, v. 5, p. 125-34, 1975.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA-NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.

ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1862-1867, 2002.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In.: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. v. 13. Piracicaba: FEALQ, 2008.

ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Caderno Didático. Ciências Agrárias. 2002.

ROVATTI, B., BRENNAN, R.J. Experimental thermal burns. **Industrial Medicine and Surgery**, v. 28, p. 364-368, 1959.

SAKS, Y.; BARKAI-GOLAN, R. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, p. 159-165, 1995.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13. n. 4. p. 242-249, 2003.

SCHORNACK, S.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; JONES, J. B.; LAHAYE, T. Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. **New Phytologist**, v. 179, p. 546-556, 2008.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W. R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers.

Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 45, p. 304-304, 1994.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência . In. CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p. 227-236, 2004.

SKADHAUGE, B.; THOMSEN, K.; VON WETTSTEIN, D. The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. **Hereditas**, v. 126, p. 147–160, 1997.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.137-144, 2008.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Impacto ambiental do fungicida metalaxil**. 96 p. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

SILVA, J. B. C.;GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: EMBRAPA. Comunicação para transferência de tecnologia: Embrapa-CNPQ, 169 p. 2000.

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

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. Indutores abióticos. In. CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, v. 161, p. 119–128, 2006.

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

STATSOFT. **Electronic Statistics Textbook**. Tulsa. Disponível em <<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>> Acesso em 05 Agosto 2008.

STINTZI, A. et al. Plant ‘pathogenesis-related’ proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.

SUDHAKAR, N. et al. Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against *Cucumber mosaic virus* by using ozone. **Journal of Virological Methods**. v. 139, p. 71–77, 2007.

SURJUSHE, A.; VASANI, R.; SAPLE, D. *Aloe vera*: A short review. **Indian Journal of Dermatology**, v. 53, n. 4, p. 163-166, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J. Controle da pinta preta do tomateiro com o uso de acibenzolar-S-metil isolado, em mistura com fungicidas e em programas de aplicação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.4, p. 481-487, 2005.

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

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p. 147–157, 2006.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259-88, 1980.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44. p. 135–62, 2006.

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**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’ : II. Changes in protein constitution after infection with *Tobacco mosaic virus*. **Virology**, v. 40, n. 2, p. 199-211, 1970.

WANG, H. et al. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 127–132, 2008.

WARNER, J. **Crop Protection. Ontario Horticultural Crops Research and Services Committee 2002**. Annual Report – Tomato. 2003. <<http://www.gov.on.ca>> Acesso em: 09 maio 2008.

WIERZBICKI, R. **Identificação de raças de *Xanthomonas* spp. patogênicas a pimentão no estado de São Paulo**. 62 p. – Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2004.

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

YAFEI, C. et al. Functions of oligochitosan induced protein kinase in *Tobacco mosaic virus* resistance and pathogenesis related proteins in tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 724–731, 2009.

YAKOVLEV, G. et al. Low molecular weight chitosan is an efficient inhibitor of ribonucleases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, p. 584–588, 2007.

YOUNG, J. M. et al. 2001. Classification, nomenclature, and plant pathogenic bacteria – A clarification. **Phytopathology**, v. 91, p. 617-620, 2001.

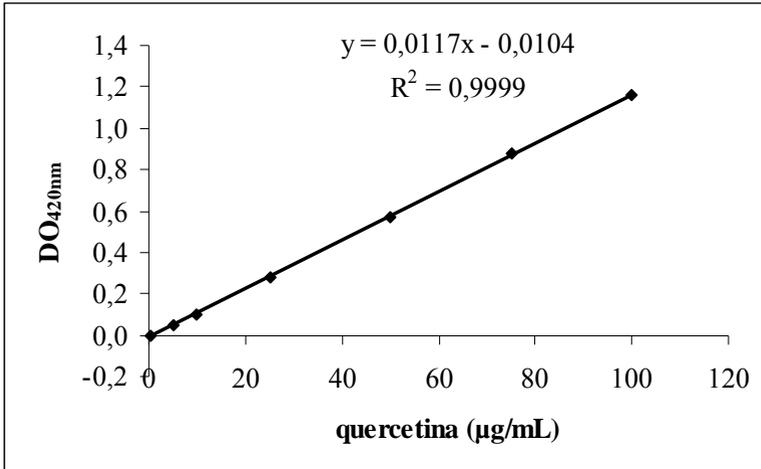
ZANÃO JUNIOR, L. A.; FONTES, R. L. F.; AVILA, V. T. Aplicação do silício para aumentar a resistência do arroz à mancha-parda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n.2, p. 203-206, 2009.

ZHANG, D. L.; QUANTICK, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, n. 2, p.195-202, 1997.

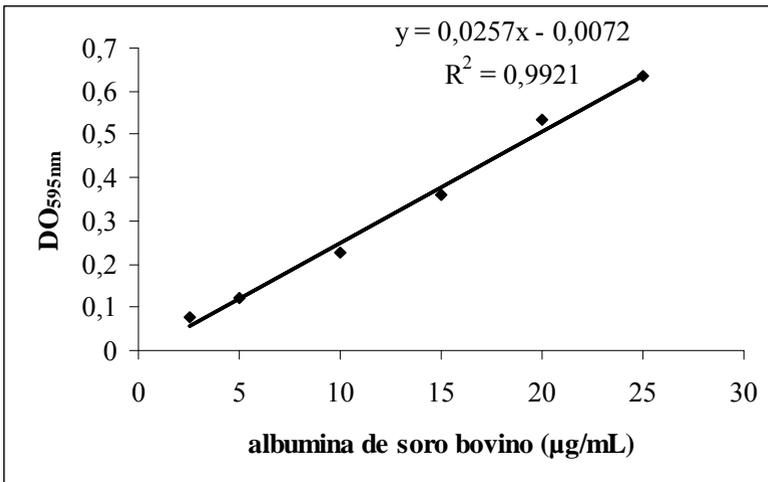
ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 527–530, 2003.

7 APÊNDICES

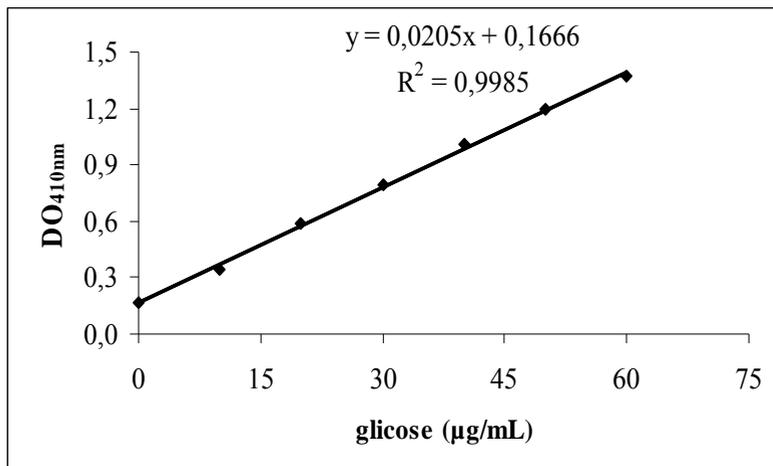
Apêndice 1 - Curva padrão para dosagem de flavonóides.



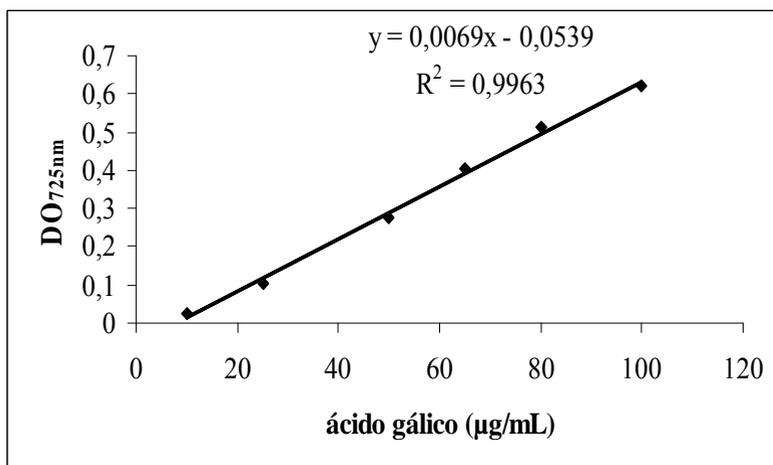
Apêndice 2 - Curva padrão para dosagem de proteínas totais através do método de Bradford.



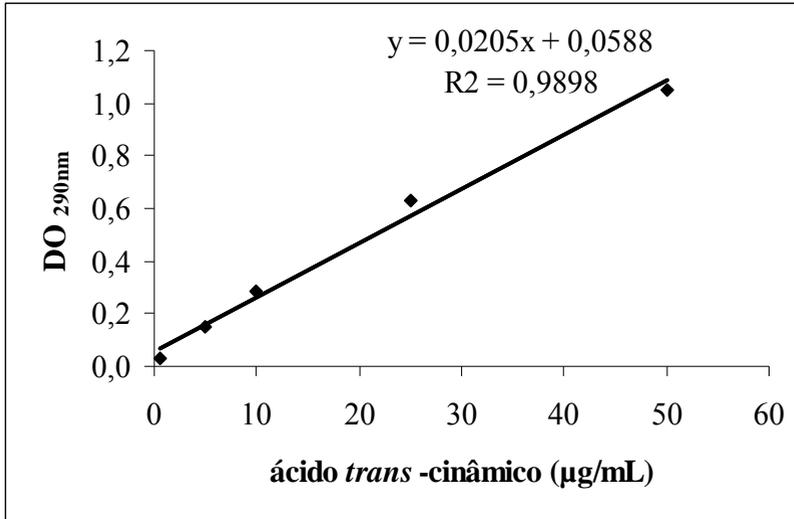
Apêndice 3 - Curva padrão para dosagem de açúcares redutores através do método de Lever.



Apêndice 4 - Curva padrão para dosagem de compostos fenólicos pelo método Folin Ciocalteu.



Apêndice 5 - Curva padrão para dosagem de fenilalanina amônia-liase.

Apêndice 6 - Análise da variância do crescimento de *Xanthomonas gardneri* em meio NA acrescido de HCl, Qcom, Qbpm ou Qmpm a 4 mg/mL.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	P
Tratamentos	3	1,16	0,39	14,6	0,000
Erro	10	0,02	0,002		

Apêndice 7 - Análise Krusk-Wallis do crescimento de *Xanthomonas gardneri* em meio NA acrescido de HCl, Qcom, Qbpm ou Qmpm a 0,25; 1 ou 4 mg/mL.

Fontes de variação	GL	H	CV	p
Tratamentos	9	35,6	7,46	0,000

Apêndice 8 - Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas tratadas com HCl, ASM, Qcom, Qbpm, Qmpm a 1 mg/mL, aos 3 dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	P
Tratamentos*	4	0,78	0,2	16,6	0,0004
Erro	18	0,40	0,02		

* Dados transformados em logaritmo na base 10.

Apêndice 9 - Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas tratadas com Qcom, Qbpm, Qmpm a 1 mg/mL, às 24, 48 ou 72h dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	P
Tratamentos	9	2.030,4	225,6	27,8	0,000
Erro	22	693,3	31,5		

Apêndice 10 - Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas tratadas com Qcom, Qbpm, Qmpm a 0; 0,75; 1,5 e 3 mg/mL, aos 3 dias antes da inoculação.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	p
Tratamentos	2	2,65	1,32	21,8	0,675
Concentração	3	201,85	67,28		0,000
Tratamento*Concentração	6	2,96	0,49		0,988
Erro	28	93,11	3,33		

Apêndice 11 – Análise de variância do conteúdo de compostos fenólicos aos 6 dias após o tratamento (3 dias após a inoculação) de plantas de tomate com HCl, ASM e Qbpm 3 mg/mL.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	p
Tratamentos	2	2.317,47	1.158	10,7	0,000
Erro	7	195,70	27,96		

Apêndice 12 – Análise de variância do conteúdo de flavonoides aos 6 dias após o tratamento de plantas de tomate com HCl, ASM e Qbpm 3 mg/mL.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	p
Tratamentos	2	19,8e+04	98,8e+03	22,3	0,010
Erro	7	71,9e+03	10,3e+03		

Apêndice 13 – Análise de variância da atividade da fenilalanina amônia-liase aos 6 dias após o tratamento (3 dias após a inoculação) de plantas de tomate com HCl, ASM e Qbpm 3 mg/mL.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	P
Tratamentos	2	7,78	3,89	23,2	0,409
Erro	7	26,7	3,81		

Apêndice 14 – Análise de variância da atividade da peroxidases aos 6 dias após o tratamento (3 dias após a inoculação) de plantas de tomate com HCl, ASM e Qbpm 3 mg/mL.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	p
Tratamentos	2	12,87	6,43	9,61	0,03
Erro	7	6,79	0,97		

Apêndice 15 – Análise de variância da atividade da glucanases aos 6 dias após o tratamento (3 dias após a inoculação) de plantas de tomate com HCl, ASM e Qbpm 3 mg/mL.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	p
Tratamentos	2	28,64	14,32	17,6	0,523
Erro	7	141	20,14		

Apêndice 16 – Análise de variância da severidade da pinta preta em plantas tratada com Qcom, Qbpm, Qmpm a 0; 1,5; 3 e 6 mg/mL, aos 2 dias antes da inoculação com *Alternaria solani*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	P
Tratamentos	2	66,22	33,11	28,3	0,223
Concentração	3	75,61	25,20		0,327
Tratamento*Concentração	6	103,22	17,20		0,569
Erro	44	937,18	21,30		

Apêndice 17 - Análise de variância da severidade da pinta preta em plantas tratadas com HCl, ASM ou Qbpm 1,5 e 3 mg/mL aos 3 ou 5 dias antes da inoculação com *Alternaria solani*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	P
Tratamentos	5	160,93	32,19	24,9	0,110
Erro	30	487,32	16,24		

Apêndice 18 – Análise de variância germinação de conídios e crescimento micelial de *Alternaria solani* na presença de Qcom, Qbpm e Qmpm a 0; 0,125; 0,250; 0,500 e 1 mg/mL.

Germinação de conídios					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	p
Tratamentos	2	0,87	0,44	10,04	0,968
Concentração	4	52.014	26.007		0,000
Tratamento*Concentração	7	63,15	15,79		0,339
Erro	26	345,25	13,28		

Crescimento micelial					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	CV	p
Tratamentos	2	0,009	0,005	19,9	0,639
Concentração	4	1,09	0,273		0,000
Tratamento*Concentração	8	0,091	0,011		0,386
Erro	44	0,456	0,010		

Apêndice 19 – Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas tratadas com a fração polissacarídica da *Aloe barbadensis* a 0,75; 1,5; 3 ou 6 mg/mL aos 3 dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*.

Experimento 1				
Fontes de variação	GL	SQ	QM	p
Tratamentos	2	98,6e+01	492,98	0,006
Erro	15	10e+02	66,66	

Experimento 2				
Fontes de variação	GL	SQ	QM	P
Tratamentos	4	195,43	48,86	0,004
Erro	13	93,16	7,17	

Experimento 3				
Fontes de variação	GL	SQ	QM	P
Tratamentos	4	283,07	70,77	0,525
Erro	19	16,2e+02	85,40	