



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA DELGADO MUNHOZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS
EXTRACELULARES DE *Pseudomonas aeruginosa* NO
CONTROLE DE *Pectobacterium carotovorum* subsp.
carotovorum EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*)**

LUANA DELGADO MUNHOZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS
EXTRACELULARES DE *Pseudomonas aeruginosa* NO
CONTROLE DE *Pectobacterium carotovorum* subsp.
carotovorum EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M966a Munhoz, Luana Delgado

Avaliação da atividade de compostos extracelulares de *Pseudomonas aeruginosa* no controle de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) / Luana Delgado Munhoz. – Londrina, 2014.
93 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 2. Tomate – Doenças e pragas – Teses. 3. Pragas – Controle biológico – Teses. Andrade, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 632.937

LUANA DELGADO MUNHOZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS EXTRACELULARES
DE *Pseudomonas aeruginosa* NO CONTROLE DA *Pectobacterium
carotovorum* subsp. *carotovorum* EM TOMATEIRO (*Solanum
lycopersicum*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Maria Isabel Balbi Peña
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de março de 2014.

MUNHOZ, Luana Delgado. **Avaliação da atividade de compostos extracelulares de *Pseudomonas aeruginosa* no controle de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*)**. 2014. 93 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia– Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O tomate é uma hortaliça de grande relevância econômica mundial e nacional. A podridão mole do tomateiro é causada pela bactéria Gram negativa *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) que coloniza os vasos condutores da planta em qualquer fase do cultivo, esta doença não é controlada com produtos químicos, existindo a necessidade de novas alternativas para controle da doença. O uso de *Pseudomonas* sp. tem potencial para exploração como pesticida biológico, reduzindo o uso de pesticidas químicos na agricultura. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação de compostos extracelulares de *Pseudomonas aeruginosa* no controle da Pcc em tomateiro. O processo de produção e extração do composto antibiótico foi realizado de acordo com a patente registrada PI0803350-1 – INPI 12/09/2008. As frações antibióticas foram obtidas por cromatografia líquida em coluna a partir da purificação dos metabólitos brutos da cepa LV. Para purificação de fenazina-1-carboxiamida foi utilizada a metodologia de Shanmugaiah et al. (2010) adaptada para uso em sistema automatizado de cromatografia flash (FP 971 - Agilent®). Para avaliação da atividade antibiótica foram realizados os testes de difusão em disco, microdiluição em caldo, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em placa de 96 poços, avaliação ultra-estrutural *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na avaliação do controle da doença e da indução de resistência foram realizados testes *in vivo* em casa de vegetação com a F4A e o composto fenazina-1-carboxiamida, sendo avaliado também o efeito na produção do fruto. A comprovação da indução de resistência foi avaliada pela atividade de três enzimas relacionadas com o sistema de defesa das plantas: peroxidase, fenoloxidase e fenilalanina-amônia-liase, em plantas inoculadas e não, tratadas com o composto fenazina-1-carboxamida. Os testes em disco indicaram melhor atividade para a fração F4A em todas as concentrações testadas, sendo sua CIM 7.812 µg mL⁻¹ para Pcc. O composto fenazina-1-carboxiamida não apresentou inibição da Pcc. Na MEV foram observadas mudanças morfológicas provocadas pela fração F4A na célula bacteriana após 3 hrs de incubação. Nos testes *in vivo* foi observado o controle da doença nas plantas tratadas, além do estímulo no crescimento e produção, mostrando uma possível indução de resistência sugerida pelo aumento das atividades enzimática. Levando-se em conta a presença do composto fenazina-1-carboxamida na fração F4A, necessita-se de mais testes para comprovação da origem da ação dos resultados obtidos. O biocontrole da Pcc com a utilização de compostos do metabolismo secundário bacteriano da cepa LV de *P. aeruginosa* pode ser considerado uma ferramenta no manejo deste fitopatógeno.

Palavras-chave: Antimicrobiano. Controle alternativo. Fitopatógenos. Indução de resistência.

MUNHOZ, Luana Delgado. **A activity of extracellular compounds of *Pseudomonas aeruginosa* on *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* from tomato (*Solanum lycopersicum*)**. 2014. 93 p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia– Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Tomato is an important vegetable crop of major economic importance worldwide and in Brazil, present in various agricultural regions. The soft rot of tomato is caused by Gram-negative bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) that colonizes the conducting vessels of the plant at any stage of cultivation, this disease is not controlled with chemicals. The use of *Pseudomonas* sp. has high potential for exploitation as biological pesticide, reducing the use of chemical pesticides in agriculture there is a need for new alternatives to control the disease. The aim of this study was evaluate the action of extracellular compounds of *Pseudomonas aeruginosa* in the control of Pcc in tomato. The process for production and extraction of the antibiotic compound was performed according to the registered patent PI0803350-1 - PTO 12/09/2008. The antibiotic fractions were obtained by liquid vaccum column chromatography from the purification of raw metabolites of strain LV. For purification of phenazine-1-carboxamide was used methodology of Shanmugaiah et al, 2010, adapted for use in automated flash chromatography (PF 971 - Agilent ®). To evaluate the antibiotic activity was used testing disk diffusion broth microdilution for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) in 96-well plate, ultrastructural evaluation in vitro by scanning (SEM) electron microscopy were performed. For evaluation of disease control and induction of resistance, in vivo tests were conducted in a greenhouse with F4A compound and phenazine-1-carboxamide, and evaluated the effect in stimulating the production of fruit. To prove the induction of resistance was evaluated the activity of three enzymes of protecting plants: peroxidase, phenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in inoculated and not treated with phenazine-1-carboxamide compound. As a result, the disk tests showed the best activity for F4A fraction at all concentrations tested, with a MIC 7.812 mg mL⁻¹ for Pcc. The compound phenazine-1-carboxamide showed no inhibition of Pcc. In MEV, morphological changes were observed in the bacterial cell after 3hrs of incubation. In vivo testing of disease control, was observed in treated plants, in addition to stimulating the growth and production, the induction of resistance suggested by the increasing enzymatic activities. Taking into account the presence of the compound phenazine-1-carboxamide fraction F4A, will be need more tests to prove the origin of the action results. The biocontrol against Pcc with compounds derived from bacterial secondary metabolism of LV strain of *P. aeruginosa* can be considered a tool in the management of this pathogen.

Keywords: Antimicrobial. Alternative control. Plant pathogens. Induction of resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Microscopia Eletrônica de Varredura de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.24
- Figura 2** - Efeito da fração F4A (7.81µg mL⁻¹) na ultraestrutura de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Células bacterianas após 30 min. de incubação [células não tratadas (A) e tratadas (B)], células bacterianas após 90 min. de incubação [células não tratadas (C) e tratadas (D)]; células bacterianas após 3 h de incubação [células não tratadas (E) e tratadas (F)].....87
- Figura 3** - Efeito da fração F4A na altura, peso seco de parte aérea e de raiz de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) após 60 dias do transplante e infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* cultivadas em casa de vegetação em condições controladas. A. Altura da planta (C.V= 19.24%); B. Peso seco parte aérea (C.V= 11.57%); C. Peso seco da raiz (C.V= 5.10%).....88
- Figura 4** - Efeito da fração F4A e fenazina-1- carboxamida na altura de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) após 60 dias do transplante e infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* cultivadas em casa de vegetação em condições controladas. (C.V= 6.61%).....89
- Figura 5** - Efeito da fração F4A e fenazina-1- carboxamida na altura de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) após 60 dias do transplante e infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* cultivadas em casa de vegetação. A. Plantas não infectadas (C.V= 20.24%); B. Plantas infectadas (C.V= 10.68%).....90
- Figura 6** - Atividade enzimática em folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) tratadas com fenazina-1-carboxamida (3.5 e 37µg mL⁻¹) após infecção com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. A. peroxidase; B. polifenoloxidase; C. fenilalanina-amônia-liase. Os dias começaram a ser contados após inoculação do patógeno.(----) não inoculadas; (- - -) inoculadas91

- Figura 7** - Avaliação da produtividade de tomates em plantas tratadas com fenazina-1-carboxamida, e infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* aos 60 dias em casa de vegetação. A. número de frutos colhidos em plantas não infectadas (C.V= 38.02%); B. número de frutos colhidos em plantas infectadas (C.V= 38.02%).....92
- Figura 8** - Avaliação da produtividade de tomates (g) em plantas tratadas com fenazina-1-carboxamida, e infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* aos 60 dias em casa de vegetação. A. número de frutos colhidos em plantas não infectadas (C.V= 6.32%); B. número de frutos colhidos em plantas infectadas (C.V= 3.87%).....93

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Determinação atividade antibiótica da fase diclorometano (FD) e F4A pelo teste de disco seco e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da fração F4A por microdiluição em caldo LB de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*81
- Tabela 2.** Índice de mortalidade de plantas de tomateiro (após 60 dias em casa de vegetação) tratadas em aplicações curativas ou preventivas com a fração F4A e inoculadas com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.....83
- Tabela 3.** Avaliação da presença/ausência de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* realizado em plantas inoculadas e tratadas com a fração F4A e fenazina-1-carboxiamida após 60 dias em casa de vegetação.....84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido Indol Acético
ASM	Acibenzolar-S-metil
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
CPG	Caseína, Peptona e Glicose
DF	Fator de Diluição
DO	Densidade Óptica
DMP	2,6-Dimetoxifenol
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
FAAtb	Fração Antibiótica obtida por cromatografia automatizada
FAInd	Fração com presença de compostos do grupo das Indolinonas
FAFen	Fração com presença de compostos fenazínicos
FAFen01	Fração obtida no segundo processo cromatográfico
FAFen02	Fração obtida no segundo processo cromatográfico
FAFen03	Fração obtida no segundo processo cromatográfico
FD	Fase Diclorometano
FAL	Fenilalanina Amônia-liase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISR	Resistência Sistêmica Induzida
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-Oxidase
PCA	Fenazina-1-carboxílica
Pcc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
PCN	Fenazina-1-carboxiamida
PFO	Polifenoloxidasas
POX	Peroxidasas
PR	Proteínas Relacionadas a Patogênese
PVP	Polivinilpirrolidona
PYO	Piocianina
UFC	Unidade Formadora de Colônias
TTC	Trifeniltetrazólio-2,3,5- Cloreto
Xcc	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	GERAL	18
2.2	ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	A CULTURA DO TOMATE	19
3.2	BREVE HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DO TOMATE	20
3.3	IMPORTÂNCIA DO TOMATE NO BRASIL	21
3.4	PODRIDÃO DO TOMATEIRO CAUSADA POR <i>PECTOBACTERIUM</i> <i>CAROTOVORUM</i> SUBSP. <i>CAROTOVORUM</i>	23
3.4.1	Agente Causal	23
3.4.2	Infecção	25
3.4.3	Sintomas da Doença	27
3.4.4	Controle da Doença	28
3.5	CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS	29
3.5.1	Potencial de <i>P. aeruginosa</i> no controle de doenças	30
3.5.2	Indução de Resistência	32
3.5.2.1	Alterações fisiológicas da indução de resistência	33
3.5.2.1.1	<i>Proteínas</i>	34
3.5.2.2	Alterações bioquímicas da indução de resistências	34
3.5.2.2.1	<i>Peroxidase</i>	34
3.5.2.2.2	Polifenoloxidase	35
3.5.2.2.3	<i>Fenilalanina amônia- liase</i>	36
3.5.2.3	Fenazina-1-carboxiamida	36
3.5.2.4	Acibenzolar-S-Metil(Bion)	37
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ARTIGO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS EXTRACELULARES DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NO CONTROLE DE <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> EM TOMATEIRO.....	48
RESUMO	49
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
2.1 <i>Agente Patogênico</i>	53
2.2 <i>Agente Antagonista</i>	53
2.3 <i>Produção e Extração dos Metabólitos Bioativos</i>	53
2.4 <i>Métodos Cromatográficos</i>	54
2.4.1 <i>Semi-purificação de Compostos Antibióticos</i>	54
2.4.2 <i>Purificação de fenazina-1-carboxiamida</i>	54
2.4.3 <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	55
2.5 <i>Avaliação da Atividade Antibiótica do Sobrenadante</i>	55
2.6 <i>Avaliação da Atividade Antibiótica in vitro</i>	56
2.6.1 <i>Ensaio de Atividade Antibiótica das Frações Obtidas na CLV</i>	56
2.6.2 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	57
2.7 <i>Ensaio em Casa de Vegetação</i>	58
2.7.1 <i>Avaliação da Doença</i>	60
2.7.1.1 <i>Isolamento bacteriano</i>	60
2.7.1.2 <i>Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura</i>	60
2.7.2 <i>Indução do Desenvolvimento Vegetal</i>	61
2.7.2.1 <i>Análises bioquímicas</i>	62
2.7.2.1.1 <i>Coleta de amostras</i>	63
2.7.2.1.2 <i>Obtenção dos extratos protéicos</i>	63
2.7.2.1.3 <i>Teor de proteína total</i>	64
2.7.2.1.4 <i>Determinação da atividade de peroxidase de guaiacol</i>	64
2.7.2.1.5 <i>Determinação da atividade de polifenoloxidase</i>	65
2.7.2.1.6 <i>Determinação da atividade de fenilalanina amônia- liase</i>	65
2.8. <i>Avaliação da Produtividade</i>	66
3 RESULTADOS	66

4	DISCUSSÃO	70
5	CONCLUSÃO	75
6	AGRADECIMENTOS	75
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8	TABELAS E FIGURAS	81

1 INTRODUÇÃO

O intenso desenvolvimento da agricultura trouxe como consequência a incidência de doenças vegetais em níveis que exijam controle. As bactérias fitopatogênicas são patógenos de grande importância pela gravidade das enfermidades que acometem em culturas de importância econômica, pela facilidade com que se disseminam e pelas dificuldades para o seu controle.

Contudo, há fitobacterioses extremamente destrutivas, que matam o hospedeiro ou acarretam graves prejuízos na produção, até inviabilizando o cultivo de certa espécie em uma área ou região. A fitobactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* é uma delas, ocorrendo em condições ambientais de alta temperatura e umidade e sendo responsável por uma série de doenças na região Nordeste do Brasil, onde as condições para seu desenvolvimento são mais favoráveis (ZAMBOLIM et al., 1997).

Para combater os problemas trazidos por essas doenças o uso intensivo de agrotóxicos se tornou comum (MOTOYAMA et al., 2003), graças a simplicidade de uso e resultados positivos que trazem a curto prazo. A longo prazo acabam trazendo prejuízos, como o acúmulo de compostos e surgimento de micro-organismos resistentes (VENTUROSIO et al., 2011).

A cultura do tomate é uma das mais exigentes na utilização de agrotóxicos, devido à sua susceptibilidade dessa cultura, sendo muitas vezes feita de forma incorreta e em excesso, tendo como consequência a contaminação que compromete o meio ambiente e a saúde do consumidor (LATORRACA et al., 2008).

1 Dentre as alternativas de controle livres de resíduos de
2 agroquímicos (LOPES, 2009), o controle biológico se destaca como uma promissora
3 alternativa no combate a fitopatógenos, com a utilização de agentes biológicos
4 (fungos, bactérias, vírus, insetos e nematóides), inimigos naturais. Tais agentes
5 estão naturalmente presentes no ambiente dessas culturas, tendo papel antagonista
6 e impedindo a progressão da doença (FERNANDES, 2008; MICHEREFF, 2009).

7 Essa estratégia se baseia na competição por espaço ou nutrientes,
8 indução de resistência ou produção de metabólitos com atividade antibiótica,
9 aplicados a partir de esporos, células vegetativas ou metabólitos, além de possuírem
10 um amplo espectro de ação (RAAIJMAKERS, 2002).

11 Segundo Oliveira *et al* (2011) um composto secundário do
12 metabolismo de *Pseudomonas* sp. foi eficiente no controle de *Xanthomonas*
13 *axonopodispv.citri* cepa 306, sinônimo *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

14 Há evidência da capacidade da planta em se tornar resistente a
15 doenças em decorrência do contato com o patógeno ou quando influenciada por
16 uma substância denominada estimulador, após o contato pode haver a formação de
17 substâncias de defesa ou propriedades da planta, tais como inibidores pré-
18 formadores do crescimento ou barreiras estruturais contra a penetração dos
19 patógenos (AIST, 1983).

20 Considerando a inexistência de produtos não tóxicos e que
21 controlem efetivamente as doenças de plantas, o uso de métodos alternativos de
22 controle, como o uso de compostos bacterianos com atividade antibiótica está sendo
23 intensivamente avaliado.

1 Neste contexto, procurando explorar uma nova alternativa para o
2 controle da podridão-mole do tomateiro, a eficiência de compostos extracelulares
3 produzidos durante o cultivo de *P. aeruginosa* será avaliada no controle de *P.*
4 *carotovorum* subsp. *carotovorum*, e na sua capacidade em induzir resistência no
5 tomateiro.

6

7 **2 OBJETIVOS**

8 2.1 GERAL

9 Avaliar a atividade de compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas*
10 *aeruginosa* no controle *in vitro* de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e
11 de podridão mole em mudas de tomateiro.

12

13 2.2 ESPECÍFICOS

14 a) Obter compostos extracelulares bacterianos bioativos produzidos durante o
15 crescimento da cepa LV de *Pseudomonas aeruginosa*;

16

17 b) Fracionar ou compostos com atividade antibiótica por métodos cromatográficos
18 por adsorção.

19

20 c) Avaliar a atividade antibiótica *in vitro*, através do teste de halo de inibição e
21 determinação da concentração inibitória mínima;

22

23 d) Avaliar a ação dos compostos bioativos no controle da Pcc em mudas de
24 tomateiro em condições de casa de vegetação;

25

1 e) Avaliar a atividade dos compostos bioativos em ativar a indução de resistência em
2 mudas de tomateiro;

3

4 f) Observar os efeitos da fração antibiótica em contato com as células de
5 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* pela microscopia eletrônica de
6 varredura.

7

8 **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

9

10 **3.1 A CULTURA DO TOMATE**

11 O tomateiro, anteriormente (*Lycopersicon esculentum* Mill),
12 reclassificado e agrupado no gênero *Solanum* e, por conseguinte, na espécie
13 *Solanum lycopersicum* L. (PERALTA et al., 2006) pertence a família Solanacea,
14 assim como a berinjela, pimentão, fumo, jiló, entre outros.

15 Somente no século XIX é que o tomate passou a ser consumido e
16 cultivado em escala cada vez maior, inicialmente na Itália, depois na França e na
17 Espanha. Na Espanha e Itália, o tomate foi batizado de pomo d'oro (maçã de ouro)
18 (GOULD, 1992). Atualmente o tomate é uma fruta produzida e consumida
19 mundialmente (PEREIRA, 2007).

20 Os nomes comuns do tomate são: tomate (português, espanhol e
21 francês), tomat (indonésio), faanke'e (chinês), tomati (africano ocidental), tomatl
22 (nauátle), jitomate (espanhol mexicano), pomodoro (italiano), nyanya (swahili)
23 (NAIKA et al., 2006).

24 Tomates cultivados no sistema convencional, colhidos em estágio
25 vermelho, apresentam altos teores de açúcares, vitamina C e ácidos orgânicos,

1 cujos constituintes são mais importantes para o sabor e afetam diretamente a
2 qualidade do fruto (MOURA et al., 1999).

3 A espécie cultivável do tomate é uma planta herbácea de caule mole
4 e flexível, não suportando o peso dos frutos na vertical. A planta original ocorre na
5 forma de moita, por isso o tomate *in natura* é cultivado estaqueado ou envarado,
6 enquanto o industrial é cultivado rasteiro, assim as variedades são melhoradas de
7 acordo com o local e forma de cultivo e a sua finalidade (CAMARGO et al., 2006).

8 A nível mundial, a China foi o maior produtor de tomate em 2010,
9 estando o Brasil na 9ª posição correspondendo a aproximadamente 3% da produção
10 mundial. México é o maior exportador e os Estados Unidos da América o maior
11 importador de tomate (AGRIANUAL, 2012).

12

13 3.2 BREVE HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DO TOMATE

14 O tomate é um fruto originário da América do Sul, da Cordilheira dos
15 Andes onde hoje estão localizados Peru e Equador e ainda são encontradas várias
16 espécies selvagens, entre elas *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (tomate cereja), que
17 é indígena de toda América tropical e subtropical, em altitude que varia de 800 a
18 1.000 m. Os primeiros registros demonstram que os incas cultivavam e consumiam o
19 tomate como alimento. Posteriormente, o tomate foi levado para o México e para a
20 Europa somente no início do século XVI (ANDRECCEUTTI et al., 2007).

21 A planta pode ser de crescimento determinado (variedades anãs) ou
22 indeterminado que atinge 2,5 m de altura com poda (CAMARGO FILHO et al., 1994).

23 Na Europa, o fruto foi utilizado como planta ornamental, pois havia a
24 suspeita de que o fruto fosse venenoso e afrodisíaco, supostamente por causa

1 desua conexão com as mandrágoras, variedades de Solanáceas usadas em
2 feitiçaria. Sua introdução no Brasil ocorreu no final do século XIX por imigrantes
3 europeus, tornando-se a segunda hortaliça de importância (SILVA et al., 2007).

4 O tomate começou a ter relevância mundial a partir de 1900 e,
5 atualmente, é o segundo produto olerícola mais cultivado no mundo, sendo a
6 quantidade produzida superada apenas pela batata (FILGUEIRA, 2000).

7

8 3.3 IMPORTÂNCIA DO TOMATE NO BRASIL

9 O cultivo do tomateiro está presente em diversas regiões agrícolas
10 brasileiras destacando-se os estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Paraná
11 (AGRIANUAL, 2012). Esse estados somaram em 2011, de acordo com o IBGE,
12 65.262 hectares da cultura no Brasil, sendo quase sua totalidade exportada para a
13 Guiana Francesa.

14 No contexto global, o Brasil passou a ser o oitavo maior produtor
15 suplantando em relação às safras anteriores a Espanha. Em relação à área colhida,
16 permanece nadécima quarta posição. A safra nacional 2009/10 totalizou 66.023
17 hectares, área 12,1% superior a safra 2008/09 e 6,3% maior que a safra 2007/08. O
18 rendimento médio da safra nacional 2009/10 atingiu 63.684 quilos por hectare, 6,2%
19 superior à safra anterior e 0,7% maior que o obtido na safra 2007/08 (IBGE, 2010).

20 A produção de tomate em São Paulo, maior estado produtor
21 brasileiro, é determinado pelas condições climáticas. Por exemplo, o tomate é
22 susceptível à geada e não produz bem sob muito calor, como outras plantas de
23 clima subtropical. Dessa forma, características climáticas, sócio-econômicas e
24 proximidades do mercado determinam diferentes épocas de cultivo por Microregiões

1 Homogêneas no estado de São Paulo e municípios (CAMARGO FILHO et al.,1994).

2 No Nordeste, a cultura é explorada principalmente por pequenos
3 produtores rurais. Dessa forma, a atividade possui grande importância sócio-
4 econômica para a Região, com ênfase para os Estados de Pernambuco, Bahia e
5 Ceará (IBGE).

6 O último levantamento sobre área cultivada no país, realizado pela
7 ABCSEM em 2008, apontou um total de 55 mil hectares, sendo que desse total, 31%
8 (17 mil hectares) são destinados para o segmento de processamento.

9 A cadeia produtiva de tomate tem forte relevância econômica no
10 agronegócio brasileiro, pois movimenta uma cifra anual superior a R\$ 2 bilhões
11 (cerca de 16% do PIB gerado pela produção de hortaliças no Brasil). Aliado a isso, o
12 cultivo é um dos mais importantes geradores de emprego na atividade rural do
13 Brasil, embora existindo uma forte instabilidade de preços devido a inexistência do
14 zoneamento de produção (ABCSEM, 2012).

15 A produtividade de tomate no Brasil é de 59 toneladas por hectare
16 ou cerca de 5 kg/pé (245 caixas/mil pés de tomate). Pode-se afirmar que, nos
17 últimos 20 anos, a tomaticultura nacional duplicou a produtividade, onde produtores
18 de tomate em estufa tem alcançado rendimentos expressivos, acima de 500 caixas
19 de 22 kg em estufas médias de 350 m². Quanto ao segmento industrial, também
20 houve um crescimento de produtividade no país, saltando de um rendimento de 35
21 toneladas na década de 90, para uma produtividade média próxima a 80 toneladas
22 por hectare (ABCSEM, 2012).

23

1 3.4 PODRIDÃO DO TOMATEIRO CAUSADA POR *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. 2 *CAROTOVORUM*

3 A podridão do tomateiro também é chamada de podridão mole, talo-
4 oco ou canela preta, todas causadas pela bactéria *P. carotovorum* subsp.
5 *carotovorum*, sinônimo *Erwinia carotovora*. É uma doença muito comum no
6 tomateiro, com incidência mundial, dependente de condições ambientais e do estado
7 nutricional das plantas.

8 A maior ocorrência e severidade da doença acontecer em condições
9 de alta temperatura, acima de 25 °C e alta umidade do solo causada por irrigação ou
10 excesso de chuva, já que essas bactérias podem sobreviver em ausência de
11 oxigênio, com conseqüente menor competição de outro micro-organismo (MARIANO
12 et al, 2005; LOPES; HENZ, 1998).

13 A podridão pode ocorrer durante o crescimento da planta, na
14 colheita, no armazenamento, transporte e comercialização, trazendo grandes perdas
15 e grande importância econômica, dependendo da severidade do ataque, das
16 condições durante e depois colheita (MARIANO et al, 2005; PÉROMBELON;
17 KELMAN, 1980).

18

19 3.4.1 Agente Causal

20 As bactérias do gênero *Pectobacterium* caracteriza-se como
21 bastonetes, com 0,7 x 0,15 µm, Gram-negativos, quimiorganotrófico, apresentam
22 flagelos peritríquios, são aeróbicas facultativas e não formam esporos (Fig. 1).
23 Apresentam resultado negativo para teste de oxidase e positivo para catalase,
24 produzem enzimas pectinolíticas, mas não fosfatase e pectinase, fermentam glucose

1 e hidrolisam gelatina. As colônias geralmente são de coloração creme e algumas
2 possuem cor amarela, apresentam crescimento ótimo entre 25 e 30°C com umidade
3 100% e são saprófitas no solo na ausência de hospedeiros (AMORIM, 2005; SILVA,
4 2005).

5



7 **Figura 1-** Microscopia Eletrônica de Varredura de *P. carotovorum*. Foto do autor.

8

9 O cultivo deste fitopatôgeno em meio CPG (caseína, peptona,
10 glicose e agar) em incubação a 24 °C por 48 h, permite a observação de colônias de
11 pectobactérias com aspecto de “vidro quebrado” (KELMAN; DICKEY, 1995).

12 As bactérias do gênero *Pectobacterium* e *Erwinia* afetam cerca de
13 setenta espécies vegetais, principalmente as hortaliças e várias plantas
14 comercialmente importantes, incluindo repolho chinês e batata (WHITEHEAD et al.,
15 2002). Diversas espécies deste patógeno são potenciais fitopatógenos, isoladas ou
16 em conjunto, sendo a de maior destaque a *P. carotovorum* (SOUZA; IAMAUTI,
17 2005).

1 Atualmente o gênero *Erwinia* pertence a família *Enterobacteriaceae*.
2 Este gênero reunia bactérias associadas a plantas como patógenos, saprófitas e
3 endófitas (MARIANO, et al., 2005; KWON *et al.*, 1997; 2000; TOTH *et al.*, 2001). No
4 entanto, Waldee em 1945 propôs a mudança das espécies pectinolíticas, do grupo
5 Carotovora, para um novo gênero, *Pectobacterium*, separando-as das necrotróficas
6 (MARIANO, et al., 2005; DYE, 1969), a separação se deve a capacidade dessas
7 bactérias em produzir altas quantidades de enzimas pectolíticas capazes de macerar
8 o tecido parenquimatoso, reclassificada em *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*
9 (Jones) (HAUBEN et al., 1998).

10 A enzima pectinaliase secretada pela bactéria libera fragmentos de
11 homogalacturonano com um resíduo de ácido 4,5 anidrogacturônico insaturado no
12 extremo do redutor, esses fragmentos apresentam atividade como elicitores da
13 síntese de inibidores de proteases, produzidas pela planta em resposta à infecção
14 (HEITEFUSS, 1997).

15 A forma de secreção dessas enzimas se dá por um sistema
16 codificado por um aglomerado de genes que elucidam uma reação de
17 hipersensibilidade em determinados hospedeiros. Essa liberação enzimática é um
18 determinante de patogenicidade, as enzimas são liberadas diretamente no citosol da
19 célula hospedeira para promover a doença (VALLS; GENIN; BOUCHER, 2006;
20 CORNELIS, 2000; GIJSEGEM, 2000).

21

22 3.4.2 Infecção

23 A infecção é favorecida por altas temperaturas e umidade abundante
24 (SOUZA, 2005). Normalmente a infecção se inicia na região do colo, evoluindo para

1 escurecimento da haste, acompanhada de decomposição (podridão mole) da
2 medula. Eventualmente, com uso de água de irrigação contaminada, pode ocorrer
3 sintomas em partes mais distantes do solo.

4 A infecção por *P. carotovorum* ocorre através de ferimentos
5 causados pelos equipamentos usados durante o cultivo, pela ação de insetos ou
6 aberturas naturais. A disseminação é propiciada pela água da chuva, água de
7 irrigação e ferramentas contaminadas, além da bactéria ser capaz de sobreviver
8 saprofiticamente por muito tempo no solo (AMORIM, 2005).

9 Após a penetração, a bactéria permanece nos espaços
10 intercelulares de tecidos parenquimatosos e eventualmente no tecido vascular, até
11 que as condições ambientais, incluindo água livre, temperatura e concentração de
12 oxigênio, tornam-se favoráveis ao desenvolvimento da doença (PÉROMBELON;
13 KELMAN, 1980; PÉROMBELON; SALMOND, 1995; PÉROMBELON, 2002).

14 A presença de água livre conduz rapidamente à anaerobiose dentro
15 do órgão. Dependendo da temperatura, a anaerobiose tem pouco efeito sobre a
16 multiplicação da bactéria, mas prejudica o sistema de defesa do hospedeiro
17 dependente de oxigênio (produção de fitoalexinas, compostos fenólicos, radicais
18 livres, entre outros), inibe a lignificação e suberização da parede celular (proteção à
19 degradação por enzimas pectinolíticas) e aumenta a turgidez das células vegetais,
20 afetando a integridade da membrana (PÉROMBELON, 2002). Assim a bactéria
21 coloniza os tecidos e produz enzimas que degradam a parede celular da planta.

22 Na patogênese, um fator importante para as bactérias pectolíticas é
23 a ação de suas enzimas, auxiliando na penetração do patógeno no interior da planta.
24 Os passos que ocorrem durante essa interação das enzimas no potencial

1 hospedeiro são: o patógeno deve conter genes que codifiquem essas enzimas;
2 esses genes são expressos no tecido infectado; as enzimas são liberadas pelo
3 patógeno no tecido hospedeiro; em alguns casos as enzimas se deparam com
4 inibidores; em outros são ativadas e clivam as estruturas poliméricas da parede
5 celular primária e lamela média, deixando o espaço livre para penetração do
6 patógeno (EMBRAPA, 2008; COLLMER; KEEN, 1986).

7 As fontes de contaminação podem ser: implementos agrícolas
8 contaminados, especialmente em culturas reproduzidas vegetativamente, processo
9 de lavagem de frutos e tubérculos, a bactéria pode ser transportada pela microflora
10 do solo, como larvas de certas moscas nematóides e minhocas, pela água de solo e
11 água de irrigação também pode dispersar efetivamente a bactéria do foco de
12 infecção no campo (MARIANO et al., 2005).

13

14 3.4.3 Sintomas da Doença

15 Os sintomas produzidos pelas bactérias pectinolíticas, sob certas
16 condições de campo, podem ser indistinguíveis e não inteiramente definidos. Fatores
17 como patógeno envolvido, condições ambientais, níveis de inóculo, espécie
18 hospedeira, grau de resistência do cultivar, nutrição da planta e manejo da semente,
19 dentre outros, influem na sintomatologia (JABUONSKI et al., 1986).

20 Os sintomas iniciais da podridão-mole são pequenas lesões
21 encharcadas, que aumentam rapidamente e causam extensa maceração e
22 apodrecimento do tecido parenquimatoso do órgão afetado (GOTO, 1992).

23 Os sintomas característicos estão relacionados a produção de
24 enzimas no meio extracelular e degradam a lamela média e parede celular. Iniciam-

1 se com a perda de água causada pela destruição dos tecidos, e leva a murcha
2 primeiramente às partes inferiores das plantas, progredindo para toda a parte aérea,
3 resultando inclusive na morte da planta. Na desintegração dos tecidos ocorre a
4 exsudação de um líquido fétido, assim como nos frutos, podendo ocorrer infecções
5 secundárias causadas por outros micro-organismos (SOUZA, 2005).

6

7 3.4.4 Controle da Doença

8 As principais medidas de controle da podridão mole são: evitar o
9 plantio em solos de baixadas mal drenados, erradicar plantas doentes, destruir
10 restos culturais, a rotação de cultura, cuidados no armazenamento e irrigação, evitar
11 excesso de umidade e utilizar adubação equilibrada (MARIANO et al., 2001), porém,
12 essas técnicas de manejo não tem sido suficientes para o controle dessa patologia
13 (TOKESHI, 1980).

14 O uso de antibióticos como cloridrato de kasugamicina, associados
15 ou não com fungicidas cúpricos foi uma opção considerada no controle da infecção,
16 entretanto, de acordo com PAIVA (1997), o controle químico não apresentou
17 resultados positivos, além se ser altamente dispendioso.

18 O controle da podridão mole em frutos de tomate pode ser realizado
19 através da aplicação de CaCl_2 a 8% por infiltração a vácuo reduzindo a severidade
20 da doença em 69,5% (GOMES et al., 2005).

21 O uso do controle biológico tem sido tentado por muitos
22 pesquisadores, mas especificamente para a cultura do tomateiro não há relatos do
23 uso do biocontrole da doença nem são conhecidas cultivares resistentes à doença
24 (MARIANO et al., 2005).

1

2 3.5 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS

3 No controle alternativo de doença estão inseridos o controle
4 biológico e o controle induzido, conhecido como indução de resistência, resistência
5 induzida e imunização, que visam controlar doenças ou pragas com menor impacto
6 ambiental, menos riscos para o homem e com redução de custos (MORAES, 1992).

7 As práticas utilizadas no controle alternativo não fazem uso de
8 defensivos agrícolas (MORAES, 1992). É uma alternativa para tentar reduzir o uso
9 de produtos químicos, que muitas vezes são usados indiscriminadamente,
10 apresentando danos ao meio ambiente e riscos, tanto para o trabalhador envolvido
11 na aplicação, quanto aos consumidores.

12 A diferença fundamental entre as duas formas de controle alternativo
13 é o fato de a ação controladora do controle biológico se dar diretamente sobre o
14 patógeno, enquanto que no controle induzido a ação ocorre na planta hospedeira,
15 modificando sua relação com o patógeno (MORAES, 1992).

16 O controle biológico de fitopatógenos pode ser realizado com a
17 utilização direta de micro-organismos antagônicos não patogênicos, existentes na
18 natureza, que agem diretamente sobre a praga ou patógeno. Essa ação pode
19 ocorrer por predação, parasitismo ou pela produção de substâncias antibióticas
20 tóxicas (antibiose), resultando na inibição ou até mesmo na morte do patógeno. Os
21 micro-organismos antagonistas podem produzir enzimas com potencial para
22 degradar a parede celular do fitopatógeno. O próprio patógeno também pode liberar
23 enzimas degradativas devido ao estresse sofrido pela falta de nutriente, oxigênio e

1 espaço, nesse caso o controle biológico se dá de forma indireta, pela competição
2 (MORAES; ROMEIRO, 1992; GOMES et al., 2001).

3 Essas substâncias secretadas por micro-organismos, principalmente
4 bactérias, quando em competição por nicho, são produtos do metabolismo
5 secundário produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano e não
6 são diretamente essenciais à sobrevivência dos micro-organismos que as produzem.
7 No entanto, os micro-organismos produtores de antibióticos são favorecidos em
8 relação aos não produtores. Uma das formas de ser mais competitivo é pela
9 produção de compostos extracelulares que inibem o crescimento de outras
10 populações microbianas, favorecendo assim a manutenção da sua população
11 (ANDRADE, 2004). Esses tipos de substâncias químicas matam ou inibem o
12 crescimento de outras espécies microbianas, mesmo em pequenas quantidades
13 (OLIVEIRA, 2008).

14 Os processos de isolamento, seleção e cultivo dos micro-organismos
15 antagonistas pelo homem permitem que eles sejam utilizados no manejo de pragas
16 e controle de doenças em grande escala. A obtenção e utilização de moléculas com
17 ação antimicrobiana produzidas por micro-organismos é uma alternativa de grande
18 potencial para o controle de fitopatógenos, uma vez que mantém a densidade
19 populacional das espécies de patógenos ou pragas em níveis economicamente e
20 ecologicamente aceitáveis e não prejudica o desenvolvimento das plantas
21 (HARMAN, 2000).

22

23 3.5.1 Potencial de *P. aeruginosa* no controle de doenças

1 Dentre os vários micro-organismos produtores de compostos
2 bioativos, as espécies do gênero *Pseudomonas* produzem uma ampla variedade de
3 metabólitos secundários que podem inibir o crescimento ou metabolismo de outros
4 micro-organismos.

5 O uso de antibióticos originados de *Pseudomonas* remonta para um
6 período anterior à “era do antibiótico”. Em 1899 foi relatado que o fluido celular da
7 cultura de *P. aeruginosa* concentrada a um décimo do seu volume inicial controlou
8 vários outros tipo de bactérias. Durante a era cerca de 50 diferentes substâncias
9 antibióticas foram descobertas (LEISINGER; MARGRAFF, 1979).

10 O uso de *Pseudomonas* sp. tem alto potencial para exploração
11 como pesticida biológico, reduzindo o uso de pesticidas químicos na agricultura. Sua
12 aplicação pode ser feita pelo uso de compostos extracelulares, em sistemas
13 radiculares, associadas a rizosfera, como competidores e outros metabólitos
14 antagonistas (HERNANDEZ, et al., 2004).

15 Um exemplo de antimicrobianos produzidos por *Pseudomonas* são
16 os compostos do grupo das fenazinas, que são substâncias que podem possuir ação
17 antibiótica, antifúngica, antitumoral e antiparasitária dependendo do seu radical e
18 são produzidos por um número considerável de cepas (CHIN-A-WOENG, et al.,
19 2003).

20 É relatado o controle de diferentes espécies do gênero
21 *Xanthomonas*, utilizando suspensões de bactérias antagonistas do gênero
22 *Pseudomonas* sp. no controle de doenças do tomate causadas por *X. campestris* pv.
23 *vesicatoria* e *X. vesicatoria* (BYRNE et al., 2005), suspensões de células de
24 bactérias epífitas (STROMBERG et al., 2000) e fenazina-1-carboxiamida produzida e

1 isolada de *P. aeruginosa* com atividade antibiótica contra *X. oryzae* pv. *oryzae*
2 (SHANMUGAIAH et al., 2010).

3 Recentemente, Oliveira et al. (2011) relatou que metabólitos
4 secundários semipurificados produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV possui alta
5 atividade antibiótica *in vitro* contra *Xanthomonas citri* sbsp. *citri* cepa 306 e na
6 formação da lesão em plantas laranja em ensaios de casa de vegetação.

7

8 3.5.2 Indução de Resistência

9 Em Fitopatologia imunidade é regra e suscetibilidade exceção
10 (AGRIOS, 1997). Mecanismos de defesa contra doenças existem nas plantas e são
11 totalmente eficientes, já que a resistência natural a patógenos age desde barreiras e
12 mecanismos, independente do início da infecção, até a ativação destes após serem
13 expostas à agentes de indução. Na resistência induzida, a planta reconhece o perigo
14 e desencadeia respostas celulares através de um sinal externo, chamado elicitor que
15 ativa e regula a expressão de genes específicos (LEITE et al., 1997).

16 Após a elicitação os sinais são transportados por toda a planta e
17 expressam a resistência, apresentando como característica principal, a
18 sistemicidade, pois a ativação ocorre não só no sítio de inoculação, mas em tecidos
19 distantes com efetividade. (PASCHOLATI, 2003).

20 A resistência sistêmica está dividida em duas classificações, a RSA
21 - Resistência Sistêmica Adquirida e a RSI – Resistência Sistêmica Induzida, sendo
22 fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes. A indução de mecanismos
23 de defesa é decorrente a exposição a um agente indutor, o termo adquirido refere-se

1 a um elicitor patogênico ou parasita, já o termo induzido se refere a um agente
2 benéfico, simbiote ou abiótico (BARROS et al., 2010).

3 As moléculas indutoras de defesa das plantas podem apresentar
4 duas origens, exógenas e endógenas, variando de acordo com o patógeno e sua
5 localização. Dentre essas moléculas destacam-se as proteínas: as lectinas,
6 inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, polifenoloxidasas (PFO), peroxidases
7 (POX), fenilalanina-amônia-liase (FAL) e as proteínas relacionadas à patogênese
8 (PR) (PINTO et al., 2011).

9

10 3.5.2.1 Alterações fisiológicas da indução de resistência

11 A condição fisiológica em que as plantas são capazes de possuir a
12 melhor defesa ou de desenvolver mais rapidamente respostas, ou ambos, é
13 chamado estado preparado da planta (CONRATH et al., 2006) ou efeito priming.

14 A síntese de proteínas relacionadas à patogênese, proteínas PR,
15 talvez seja a mais evidente alteração ocorrida no vegetal decorrente da interação
16 planta-patógeno. As proteínas PR são classificadas em cinco grupos, mas todas
17 solúveis em meio ácido, com baixo peso molecular e resistem a proteases, enzimas
18 que decompõem proteínas (GUZO, 2004).

19 O aumento na atividade de enzimas de defesa induzida por
20 elicitores permanece no tecido vegetal mesmo após o tratamento com o patógeno
21 virulento, nesse caso o tratamento prévio com o indutor de resistência predispõe as
22 plantas para ativar respostas mais rapidamente do que a planta não induzida,
23 quando em contato com o agente patogênico (MÉTRAUX, 2001).

24

1 3.5.2.1.1 *Proteínas*

2 A resistência sistêmica adquirida está primariamente associada à
3 expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese, as PRP's,
4 envolvidas na resposta de defesa das plantas. Dessas proteínas-PR algumas são
5 enzimas que fazem parte das respostas de defesa natural da planta e algumas
6 acompanham a resposta induzida (EMBRAPA, 2008).

7 As proteínas-PR foram classificadas inicialmente com base em
8 características de proteínas vegetais induzidas, mas também foram observadas em
9 plantas com ausência de patógenos, assim tornaram-se mais abrangentes, incluindo
10 proteínas induzidas por micro-organismos ou pelo ataque de insetos e em tecidos
11 com situação de estresse (VAN LOON et al., 2006).

12

13 3.5.2.2 Alterações bioquímicas da indução de resistência

14

15 3.5.2.2.1 *Peroxidase*

16 O grupo das peroxidases representa um papel importante na defesa
17 das plantas, podendo estar envolvidas na síntese de lignina, na interligação
18 oxidativa entre cadeias de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina presentes na
19 parede celular vegetal. Participam também da biossíntese do etileno e na oxidação
20 do ácido indol acético (AIA) e de compostos fenólicos (HAMMOND-KOSACK;
21 JONES, 1996).

22 As peroxidases possuem como substrato principal o peróxido de
23 hidrogênio, além de uma molécula doadora de elétrons, como o fenol ou outros

1 compostos orgânicos, agindo de forma semelhante com polifenoloxidasas
2 (TAKAHAMA; ONIKI, 2000).

3 A enzima peroxidase auxilia na formação de um ambiente tóxico
4 inibindo o crescimento do patógeno (BI; FELTON, 1995).

5 O aumento dessas enzimas foi detectado em plantas de tomate que
6 tiveram a indução à resistência ativada, atuando tanto diretamente na defesa de
7 plantas a patógenos, quanto nas vias de sinalização relacionadas a processos
8 fisiológicos. Sua ação também está envolvida no processo de lignificação e
9 suberização, que podem funcionar como barreiras físicas no combate a patógenos.
10 Sahaffi et al., (2012) afirma que a enzima peroxidase afeta a síntese de compostos
11 eficazes em conferir resistência na planta.

12 Os vegetais podem sintetizar a peroxidase, acumular e sob certas
13 condições metabólicas, transportá-lo no floema (tecido condutor da seiva em plantas
14 vasculares). Processos oxidativos demonstram ter papel importante na indução de
15 resistência, normalmente os níveis reativos de oxigênio são baixos nas células
16 vegetais, mas sua produção cresce durante a infecção por organismos vivos
17 (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

18

19 3.5.2.2.2 Polifenoloxidase

20 As enzimas polifenoloxidase são enzimas intracelulares de
21 ocorrência tanto em vegetais, animais e fungos, em seu centro ativo apresentam
22 cobre e com a presença de oxigênio catalisam dois tipos de reações, dentre essas
23 reações está a catálise de polifenóis originando substâncias tóxicas aos micro-
24 organismos, como as quinonas (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

1 Sua ativação ocorre somente quando a planta sofre o ataque dos
2 patógenos, enquanto isso fica inativa no interior das células, dentro dos tilacóides
3 dos cloroplastos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

4 5 3.5.2.2.3 *Fenilalanina amônia- liase*

6 Dentre os inúmeros compostos fenólicos produzidos pelas plantas,
7 usados na defesa contra patógenos, seja por suporte mecânico provocado pela
8 lignina ou proteção contra radiação, a classe mais abundante é catalisada pela
9 enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (TAIZ; ZEIGER, 2006).

10 Tem sido grandemente estudada devido à sua importante ação no
11 metabolismo secundário vegetal e na indução de resistência (KUHN, 2007). A
12 presença do patógeno desencadeia sua codificação através do RNA mensageiro.

13 14 3.5.2.3 Fenazina-1-carboxiamida

15 As fenazinas naturais incluem mais de 50 pigmentos heterocíclicos
16 contendo nitrogênio, são de origem bacteriana e tem espectros de absorção
17 característico, com dois picos na UV e pelo menos um pico no visível, podendo ser
18 facilmente extraídas a partir do cultivo microbiano e analisadas e quantificadas por
19 métodos cromatográficos.

20 Inibidoras do crescimento de bactérias e fungos devido a sua
21 capacidade de sofrer ciclos redox celular na presença de oxigênio, e agentes
22 redutores (incluindo NADH e NADPH) e provocar a acumulação de superóxido
23 tóxica e peróxido de hidrogênio, fatais para células de micro-organismos
24 competidores (MAVRODI et al., 2001).

1 Fenazinas naturais e sintéticas apresentam interesses significativos
2 devido ao seu potencial sobre interações bacterianas e processos biotecnológicos.
3 Elas tem sido muito pesquisadas e há mais tempo do que outros metabólitos
4 secundários bacterianos, sendo produzidas por uma variedade de bactérias,
5 especialmente *Pseudomonas*, mas também por *Burkholderia*, *Streptomyces*,
6 *Brevibacterium*, *Mycobacterium* e *Xanthomonas* (PIERSON; PIERSON, 2010).

7 São formadas no metabolismo secundário desse micro-organismos,
8 mas não apresentam nenhuma função óbvia no crescimento celular, nenhuma
9 importância como fonte de energia ou reserva de substâncias de qualquer tipo. Elas
10 servem para proteger o organismo produtor e seu habitat contra outros micro-
11 organismos e competidores microbianos, e isso melhora as condições de
12 sobrevivência no organismo hospedeiro (LAURSEN et al., 2004).

13 De acordo com Audenaert e colaboradores (2002) a fenazina-1-
14 carboxilato e um sideróforo, produzidos pela *P. aeruginosa* 7NSK2 apresentaram a
15 capacidade de induzir resistência sistêmica em tomate.

16 As principais fenazinas estudadas são: Fenazina-1-carboxílica
17 (PCA), Piocianina (PYO) e PCN (PRINCE-WHELAN et al., 2006). A PCA, de
18 coloração amarelo-limão brilhante, é praticamente a primeira fenazina a ser
19 sintetizada, principalmente em *Pseudomonas* sp.

20

21 3.5.2.4 Acibenzolar-S-Metil (Bion)

22 Bion é o nome comercial do composto Acibenzolar-S-Metil (ASM),
23 um derivado benzotiadiazólico, um análogo funcional do ácido salicílico, que se

1 destaca como um indutor abiótico, entre os elicitores químicos, o qual possibilita
2 proteção a campo contra um amplo espectro de doenças (SILVA et al., 2008).

3 O ácido salicílico promove nas células vegetais um estímulo para
4 produção de certas proteínas que são capazes de degradar a parede celular dos
5 fungos e bactérias, uma arma na invasão dos patógenos (ARAUJO; MENEZES,
6 2009).

7

8 **4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

9

10 Agrianual, **Anuário da Agricultura Brasileira**, 2012.

11

12 AGRIOS, G. N. San Diego: Academic Press, **Plant pathology**. p. 635, 1997.

13

14 AIST, J.R. Structural responses as resistance mechanisms. In: **BAILEY, A.;**
15 **DEVERALL, B.J. The dynamics of host defense**. New York: Academic Press,
16 p. 33-70, 1983.

17

18 ANDREUCETTI, C.; FERREIRA, M. D.; MORETTI, C. L.; HONÓRIO, S. L. Post-
19 harvest quality of tomato fruits cv. Andréa treated with ethylene. **Horticultura**
20 **Brasileira**, Brasília, vol. 25, n. 1, 2007.

21

22 ARAUJO, F.F.; MENEZES, D.. Indução de resistência a doenças foliares em
23 tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-
24 Metil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.169-172, 2009.

25

- 1 AUDENAERT, K., PATTERY, T., CORNELIS, P., HOFTE, M. Induction of systemic
2 resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa*7NSK2:
3 role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. **Mol Plant-Microbe Interact**, v.
4 15, p. 1147-1156, 2002.
- 5
6 BARROS, F.C. et al. Indução de resistência. **Journal of Biosciencias**, Uberlândia,
7 v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- 8
9 BI, J.L, FELTON, G.W. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary
10 compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as
11 components of induces resistance. **Journal of Chemical Ecology**, New York v.
12 21, p. 1511-1530, 1995.
- 13
14 BYRNE, J.M.; DIANESE, A.C.; JIA, P.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; LOUWS,
15 F.J.; MILLER, S.A.; JONES, J.B.; WILSON, M. Biological control of bacterial
16 spot of tomato under weld conditions at several locations in North America.
17 **Biological Control**, v.32, p. 408-418, 2005.
- 18
19 CAMARGO, F. P. et al. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da
20 década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**,
21 São Paulo, v.36, n.11, p.07-20, nov, 2006.
- 22
23 CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Phenazines
24 and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**,
25 Inglaterra , v.157, n. 3 , p. 503-523, mar. 2003.

- 1
2 COLLMER, A.; KEEN, N. T. The role of pectici enzymes in plant pathogenesis.
3 **Annual Reviews of Phytopathology**.v.24, p. 383-409, 1986.
- 4
5 CONRATH, U. GEROLD, J.M., BECKERS, V.F., PILAR, G.A., JAKAB, G., MAUCH,
6 F., NEWMAN, M.A., PIETERSE, C.M.J., POINSSOT, B., POZO, M.J., PUGIN,
7 A., SCHAFFRATH, U., TON, J., WENDEHENNE, D., ZIMMERLI, L., MAUCH-
8 MANI, B. Priming: Getting Ready for Battle. **The American Phytopathological**
9 **Society**. v.19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.
- 10
11 DYE, D. W.A taxonomic study of the genus *Erwinia*.II.The “carotovora” group. **New**
12 **Zealand Journal of Science** v.12, p. 81-97, 1969.
- 13
14 EMBRAPA.*Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia,
15 epidemiologia e controle. **Documento 261**, 2008.
- 16
17 EMBRAPA. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Documentos 250,
18 2008.
- 19
20 FIGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na
21 produção e comercialização de hortaliças – Viçosa, UFV, 2000.
- 22
23 GOULD, W.A. Tomato Production, **Processing & Technology** ; 3ed.; CTI Pub. Inc. ;
24 Baltimore, 1992.
- 25

- 1 GOMES, A.M., SILVEIRA, E.B. & MARIANO, R.L.R. Tratamento pós-colheita com
2 cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate.
3 **Horticultura Brasileira**. v. 23, p.108-111, 2001.
- 4
- 5 GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego: Academic Press,
6 p.342, 1992.
- 7
- 8 GUZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida
9 em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 2004. 236p. Tese (Doutorado em
10 Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- 11
- 12 HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant
13 defense responses. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1773 - 1791, 1996.
- 14
- 15 HARMAN, G.E. Myths and dogmas on biocontrol: Changes in perceptions derived
16 from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease** 84: 377-393,
17 2000.
- 18
- 19 HAUBEN, L., MOORE, E. R., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT,
20 J., VERDONCK, L. ; SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within
21 the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 384-
22 397, 1998.
- 23
- 24 HEITFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi**. Germany:
25 Fischer, p. 17-32, 1997.
- 26

- 1 HERNANDEZ, M. E.; KAPPLER, A.; NEWMAN, D. K. Phenazines and other redox-
2 active antibiotics promote microbial mineral reduction. **Applied and**
3 **Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 921-928, 2004.
4
- 5 IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010.
6
- 7 KUHN, O. J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por
8 acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e
9 parâmetros de produção. Tese de Doutorado: ESALQ, 2007.
10
- 11 JABUONSKI, R.E., TAKATSU, A. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Levantamento e
12 identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e
13 regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v. 11. p.185-195. 1986.
14
- 15 KELMAN, A.; HARTMAN, G.L.; HAYWARD, A.C. Introduction. In: Bacterial Wilt:
16 The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford:
17 CAB International, p.1-7, 1994.
18
- 19 LATORRACA A., MARQUES, G. J. G., SOUSA, K. V., FORNÉS, N. S. Agrotóxicos
20 utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde
21 humana. **Com. Ciências Saúde**. 19 (4): 365-374, 2008.
22
- 23 LAURSEN, J.B.; NIELSEN, J. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic
24 Analogues, and biological Activity. **Chemical Reviews**, Estados Unidos, v. 104,
25 n. 3, p. 1663-1685, fev. 2004.

- 1 LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent
2 Pseudomonads. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 3, p. 422-442, 1979.
- 3 LEITE, B. et al. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações
4 plantas- fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo
5 Fundo, v. 5, p. 235-280, 1997.
- 6
- 7 LOPES, R.B. A Indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de
8 Microrganismos no Brasil In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.).
9 Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna-SP:
10 **Embrapa Meio Ambiente** p. 15 - 28, 2009.
- 11
- 12 MARGIS-PINHEIRO et al. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje on**
13 **line**, v. 147, 1999.
- 14
- 15 MAVRODI DV, BONSALL RF, DELANEY SM, SOULE MJ, PHILLIPS G,
16 THOMASHOW LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin
17 and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J**
18 **Bacteriol.**, 2001.
- 19
- 20 MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases
21 activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium*
22 *graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, p. 491-498, 2002.
- 23
- 24 MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B., ASSIS, S.M.P., GOMES, A.M.A., OLIVEIRA,
25 I.S.; NASCIMENTO, A.R.P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de

- 1 importância no nordeste brasileiro. In: Michereff, S.J.; Barros, R. (Eds.)
2 Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife. UFRPE, p.141-169,
3 2001.
- 4
- 5 MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ALVARADO, I.C.M; SILVA, A.M.F. Bactérias
6 fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da**
7 **Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, vol. 2, p.121-153, 2005.
- 8
- 9 MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of
10 knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 13-
11 18, 2001.
- 12
- 13 MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária**
14 **Brasileira**, v.27, p. 175-190, 1992.
- 15
- 16 MOTOYAMA, M.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORI,
17 A.C.G.; SCAPIM, C.A. Efeito antimicrobiano de extratos cítricos sobre *Ralstonia*
18 *solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum.**
19 **Agronomy**, Maringá, v. 25, p. 509-512, 2003.
- 20
- 21 MOURA, M. L., SARGENT, S. A., OLIVEIRA, R. F. Efeito da atmosfera controlada na
22 conservação de tomates colhidos em estágio intermediário de maturidade.
23 **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 135-142, 1999.
- 24
- 25

- 1 NAIKA, S., JEUDE, J. L., GOFFAU, M., HILMI, M., DAM , B. A cultura do tomate.
2 Tradução de Rob Barnhoorn.Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.
3
- 4 OLIVEIRA JÚNIOR, A. G. de, MURATE, L. S., SOUZA, P. B., SPAGO, F. R.,
5 LOPES, L. P., BERANGER, J. P. O., SAN MARTIN, J. A. B., NOGUEIRA, M. A.
6 MELLO, J. C. P., ANDRADE, C. G. T. J., ANDRADE, G. Evaluation of the
7 antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas*
8 strain against the *Xanthomonas citri* pv. *Citri* 306 strain. **Biological Control**
9 **(Print)**. 56: 125 - 131, 2011.
10
- 11 PAIVA, H.F. Influência das adubações nitrogenada e potássica na incidência de
12 *Erwinia spp.* e *Alternaria solani* (Ell. &Smart.) Jones & Grout na cultura de
13 batata (*Solanum tuberosum* L.) 1997. 64p. Dissertação (Mestrado em
14 Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
15
- 16 PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. **Manual de**
17 **Fitopatologia-Princípios e Conceitos**, v. 1. São Paulo. Ed. Agronômica
18 Ceres, p.417-454, 1995.
19
- 20 PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de
21 doenças de plantas no século XXI? **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.
22 29, n. 1, p. 115-116, 2003.
23
- 24 PERALTA, I.E., KNAPP, S. & SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated
25 tomatoes.**Report on Tomato Genetics Cooperative**, v. 56, p.6-12, 2006.
26

- 1 PEREIRA, S. Processamento de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill), cv. Débora
2 cultivados de forma tradicional e orgânica, para obtenção de extratos. 2007.
3 92f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento) –
4 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.
- 5
6 PÉROMBELON, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of
7 pathogenesis. **Plant Pathology** 51:1-12. 1980.
- 8
9 PIERSON III, L.S.; PIERSON, E.A. Metabolism and function of bacteria in the
10 environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and**
11 **Biotechnology**, Alemanha, v. 86, n. 6, p. 1659-1670, 2010.
- 12
13 PINTO, M.S.T., RIBEIRO, J.M., OLIVEIRA, E.A.G. O estudo de genes e proteínas de
14 defesa em plantas. **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 9, n. 2,
15 p. 241-248, 2011.
- 16
17 RAAIJMAKERS, J.M., VLAMI, M., de SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial
18 biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**. 81: 537-547, 2002.
- 19
20 SAHHAFI, S. R., BAGHERI, F., ASSAD, M. T. Evaluation of some biochemical
21 responses in resistance of fifteen bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes
22 to wheat streak mosaic virus. **Journal of Agricultural Science**. v.4, n. 5; 2012.
- 23
24 SHANMUGAIAH, V., MATHIVANAN, N., VARGHESE, B. Purification, crystal structure
25 and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-

- 1 promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal**
2 **of Applied Microbiology**. 108: 703–711, 2010.
- 3
4 SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em plantas
5 de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia*
6 *solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. **Summa**
7 **Phytopathologica**, v.34, p. 137-144, 2007.
- 8
9 SOUZA DIAS, J.A.C.; IMAUTI, M.T. Doenças da batateira. In: KIMATI, H. et al.
10 **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo,
11 Agronômica Ceres, v. 2. p. 119 – 142, 2005.
- 12
13 STROMBERG, K.D.; KINKEL, L.L.; LEONARD, K.J. Interactions between
14 *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf
15 streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. **Biological**
16 **Control**. V. 17, p. 61-72, 2000.
- 17
18 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4 ed, p. 794, 2006.
- 19
20 TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. Flavonoids and some other phenolics as substrates of
21 peroxidase: Physiological significance of the redox reaction. **Journal of Plant**
22 **Research**, 113: 301-309, 2000.
- 23
24 TOKESHI, h.; Bergamin, f. Doenças da batata. **Manual de fitopatologia**. Doenças
25 das plantas cultivadas. São Paulo, v.2, p.102-105, 1980.

1
2 VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defence-
3 related proteins in infected plantas. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto,
4 v. 44, p. 135-162, 2006.

5
6 VENTUROSOS, L. dos R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o
7 desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p.
8 18-23, 2011.

9
10 WALDEE, E.L. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic
11 bacteria. **Iowa State J. Sci.** 19, 1945.

12
13 ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. Controle integrado de doenças de
14 hortaliças. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p.117, 1997.

15
16
17
18
19
20

21
22 **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS EXTRACELULARES DE**
23 ***Pseudomonas aeruginosa* NO CONTROLE DE *Pectobacterium carotovorum***
24 **subsp. *carotovorum* EM TOMATEIRO**

25

26 Luana Delgado Munhoz¹, Flávia Soares Lassie¹, Juliana Pistore Fontequê¹, Caroline
27 Martins¹, Vanessa Fogaça de Freitas¹, Ane Stefano Simionato¹, Martha Viviana Cely

1 Torres¹, Douglas Casaroto Peitl³, João Carlos Pallazo de Mello², Maria Inês
2 Resende⁴, Maria Isabel Balbi Peña³, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Galdino
3 Andrade^{1*}.

4

5

6 ¹Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade
7 Estadual de Londrina, Londrina, Brasil;

8 *Autor Correspondente: andradeg@uel.br

9 ²Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos,
10 Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil;

11 ³Departamento de Agronomia, Laboratório de Fitopatologia, Universidade Estadual
12 de Londrina, Londrina, Brasil;

13 ⁴Departamento de Ciências Exatas, Laboratório Bioquímica, Universidade Estadual
14 de Londrina, Londrina, Brasil;

15

16

17

RESUMO

18

19 A podridão mole do tomateiro é uma doença de incidência mundial, que ataca
20 a planta desde o cultivo até a pós-colheita, trazendo prejuízos financeiros para os
21 produtores, já que o controle químico não tem se mostrado eficiente. Baseado em
22 uma busca por novas alternativas de controle, este estudo teve como objetivo a
23 avaliação da atividade de compostos extracelulares de *Pseudomonas aeruginosa* no
24 controle da Pcc em tomateiro. Foi realizado um processo de produção e de extração

1 do composto antibiótico, onde as frações antibióticas foram obtidas por
2 cromatografia líquida em coluna a partir da purificação dos metabólitos brutos da
3 cepa LV. Para purificação de fenazina-1-carboxiamida foi utilizada metodologia
4 adaptada para uso em sistema automatizado de cromatografia flash (FP 971 -
5 Agilent®). Foram realizados testes *in vitro* para avaliação da ação antibiótica, difusão
6 em disco, microdiluição em caldo, determinação da concentração inibitória mínima
7 (CIM), avaliação ultra-estrutural *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura
8 (MEV). Testes em casa de vegetação com a F4A e o composto fenazina-1-
9 carboxiamida, avaliaram o controle da doença, a indução de resistência e o estímulo
10 na produção do fruto. Foi medida a atividade de três enzimas relacionadas à defesa
11 das plantas: peroxidase, fenoloxidase e fenilalanina-amônia-liase, em plantas
12 tratadas com o composto fenazina-1-carboxiamida. Os testes em disco indicaram
13 maior atividade para a fração F4A do que em todas as concentrações testadas,
14 sendo sua CIM $7.81 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Pcc. O composto fenazina-1-carboxiamida não
15 apresentou efeito antibiótico contra a Pcc. Na MEV foram observadas mudanças
16 morfológicas na célula bacteriana após 3 hrs de incubação. Com testes *in vivo* foi
17 observado o controle da doença nas plantas tratadas sem o aparecimento dos
18 sintomas típicos, além do aumento no crescimento e da produção, que pode ter
19 ocorrido devido a indução de resistência observada na atividade dos marcadores
20 bioquímicos. Possivelmente, a fenazina-1-carboxiamida é a responsável pela
21 indução de resistência, e quando está associada a molécula organometálica na
22 fração F4A, o efeito de proteção da planta é significativamente maior apresentado
23 maior crescimento e produção de tomates.

24

1

2 **Palavras-chave:** antimicrobianos, controle alternativo, fitopatógenos, indução de
3 resistência.

4

5

6 **1 INTRODUÇÃO**

7

8 O cultivo de plantas em regime intensivo trouxe como consequência o
9 desenvolvimento de doenças de difícil controle, sendo as bacterianas uma das
10 principais causas de redução da produção em lavouras (Romeiro, 2005).

11 O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das mais importantes hortaliças no
12 mundo em termos de produção e área de cultivo (Segui-Simarro & Nuez, 2007)
13 sendo o Brasil um dos principais produtores mundiais com uma área de cultivo de
14 65,262 ha (IBGE, 2011).

15 O tomateiro é uma das culturas mais exigentes na utilização de agrotóxicos,
16 sendo muitas vezes utilizadas de forma incorreta e em excesso comprometendo o
17 meio ambiente e a saúde do consumidor (Latorraca et al., 2008).

18 A podridão do tomateiro causada pela bactéria *P. carotovorum* subsp.
19 *carotovorum* (Pcc) é uma doença muito comum no tomateiro, com incidência
20 mundial. Sua primeira ocorrência foi relatada na década de 80 em cultivo sob estufa
21 na Grécia (Malathrakis, 1987).

22 Atualmente o gênero *Erwinia* pertence a família *Enterobacteriaceae*. Este
23 gênero reunia as bactérias associadas a plantas como patógenos, saprófitas e
24 endófitas (Mariano, et al., 2005; Kwon et al., 1997; 2000; Toth et al., 2001). No

1 entanto, Waldee em 1945 propôs a mudança das espécies pectinolíticas, do grupo
2 *Carotovora*, para um novo gênero, *Pectobacterium*, separando-as das necrotróficas
3 (Mariano, et al., 2005; Dye, 1969). Essa separação ocorreu devido a capacidade
4 desse grupo de produzir enzimas pectolíticas capazes de macerar tecido
5 parenquimatoso, se tornando *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) (Hauben
6 et al., 1998).

7 As principais medidas de controle da podridão do tomateiro são: evitar o plantio
8 em solos mal drenados, erradicar plantas doentes, destruir restos culturais, fazer a
9 rotação de cultura, aumentar os cuidados no armazenamento e irrigação, evitando o
10 excesso de umidade e utilizando adubação equilibrada (Mariano et al., 2001). O
11 controle químico não apresenta resultado positivo e não existe disponibilidade de
12 cultivares resistentes à doença na atualidade.

13 Vários micro-organismos tem sido usados na tentativa de controlar Pcc tais
14 como *Bacillus thuringiensis* (Dong et al., 2004), *Streptomyces plicatus* (Zamanian et
15 al., 2005) e rizobactérias (Barra et al., 2009). No entanto, em todos estes trabalhos
16 os micro-organismos foram utilizados como agente de controle biológico e não os
17 produtos metabólicos produzidos por eles.

18 Portanto, o controle biológico é uma alternativa eficiente e livre de resíduos
19 para o controle de doenças de plantas. Este inclui várias estratégias tais como a
20 utilização de metabólitos com atividade antibiótica (Oliveira et al., 2011) e a indução
21 de resistência (Raaljmakers, 2002). Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação
22 de compostos extracelulares de *P. eruginosa* no controle da *P. carotovorum* sbsp.
23 *carotovorum* em tomateiro.

24

1

2 **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

3

4 *2.1 Agente Patogênico*

5 Foi utilizada nos experimentos uma cepa de *P. carotovorum* subsp.
6 *carotovorum* de tomate cedida pela Dr^a Maria Jose Jimenez Pozo (Estación
7 Experimental Del Zaidín, CSIC, Granada, Espanha).O isolado bacteriano foi
8 criopreservado em glicerol (30%) em nitrogênio líquido.

9

10

11 *2.2 Agente Antagonista*

12 A cepa produtora de metabólitos secundários com atividade antibiótica usada
13 foi uma *P. aeruginosa* (cepa LV), isolada a partir de lesão velha de cancro cítrico em
14 fruto de laranja proveniente de um pomar no Município de Astorga, Paraná, Brasil
15 (Rampazo, 2004). A cepa está estocada no Laboratório de Ecologia Microbiana, da
16 Universidade Estadual de Londrina criopreservada (glicerol 30%) em nitrogênio
17 líquido.

18

19 *2.3 Produção e Extração dos Metabólitos Secundários Bioativos*

20 Para a produção do metabólito secundário com atividade antibiótica foi utilizada
21 a metodologia descrita por Oliveira et al. (2011), e patenteada em 10 de setembro de
22 2008 (PI 0803350- 1A2), com algumas modificações.

23

24 O sobrenadante livre de células foi concentrado em evaporador rotativo (Büchi
R-153) a 73 °C, até um décimo do volume inicial. Após a concentração, alíquotas de

1 100 mL do sobrenadante foram transferidas para funil de separação de 2000 mL,
2 onde foi realizada a partição líquido-líquido na razão 1:1 (v/v) do sobrenadante:
3 solvente orgânico. Para cada separação este procedimento foi repetido oito vezes
4 com o solvente orgânico diclorometano, obtendo a fase diclorometano (FD) que foi
5 em seguida concentrada em evaporador rotativo a 40 °C e armazenada a -20 °C até
6 a etapa de purificação.

7

8 *2.4 Métodos Cromatográficos*

9 *2.4.1 Semi-purificação de compostos antibióticos*

10 A FD foi submetida a cromatografia líquida a vácuo (CLV), em coluna de vidro
11 (20 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo de 51 kPa. Como fase
12 estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck), e como fases
13 móveis foram utilizados solventes orgânicos com polaridade crescente, cada fase
14 móvel (400 mL) foi dividida em duas alíquotas de 200 mL cada (A e B): hexano (F1A
15 e F1B), hexano/ diclorometano (1:1 F2A e F2B), diclorometano (F3A e F3B),
16 diclorometano/ acetato de etila (1:1; F4A e F4B), acetato de etila (F5A e F5B),
17 acetato de etila/metanol (1:1; F6A e F6B), metanol (F7A e F7B), metanol/água
18 destilada (1:1; F8A e F8B) e água destilada (F9A e F9B). As frações obtidas foram
19 concentradas em evaporador rotativo em temperatura relativa a cada solvente.

20

21 *2.4.2 Purificação de fenazina-1-carboxiamida*

22 Para purificação de fenazina-1-carboxiamida a partir da fração bruta FD foi
23 utilizado o sistema automatizado de cromatografia flash (FP 971 - Agilent®), baseada
24 em Shanmugaiah et al., (2010). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 50

1 (coluna SF25-160g - Agilent®). Como fases móveis foram utilizados solventes
2 orgânicos em polaridade crescente: hexano, hexano/diclorometano 1:1 (v:v),
3 diclorometano, diclorometano/acetato de etila 1:1 (v:v), acetato de etila, acetato de
4 etila/metanol 1:1 (v:v) e metanol. Esse processo cromatográfico resultou em 3
5 diferentes frações (FDA_{tb}, FDInd e FDFen). As frações foram submetidas a
6 avaliações por cromatografia em camada delgada (CCD) onde a fração FDFen foi a
7 que mais apresentou presença de compostos fenazínicos.

8 A FDFen, após concentrada em rotaevaporador, foi submetida a outro
9 processo de purificação em sistema automatizado. Como fase estacionária foi
10 utilizada sílica gel 35 (coluna SF10-4g – Agilent®). Como fases móveis foram
11 utilizados solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano, gradiente
12 hexano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/metanol 1:1 (v:v), metanol.
13 Neste processo foram obtidas 3 frações: FDFen01, FDFen02 e FDFen03. As frações
14 foram concentradas em evaporador rotativo a 50 °C.

15

16 *2.4.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)*

17 Todas as frações obtidas foram analisadas e monitoradas por CCD com placas
18 recobertas com sílica – gel 60 F₂₅₄ (Merck®) com 0.200 mm de espessura. Como
19 fase móvel para a identificação dos compostos fenazínicos, empregou-se uma
20 mistura de [6:4] hexano/acetato de etila.

21 As propriedades físicas, tais como aparência, cor, odor e solubilidade foram
22 determinadas de acordo com os procedimentos padrão.

23

24 *2.5 Avaliação da Atividade Antibiótica do Sobrenadante*

1 A avaliação da ação antibiótica foi realizada pelo método de difusão em agar
2 com poços de 9 mm de diâmetro equidistantes na placa. O inóculo de *P.*
3 *carotovorum* subsp. *carotovorum* foi obtido a partir de cultura em fase exponencial a
4 uma concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ (D.O. = 0,1; λ = 590 nm) e foi inoculado em
5 placa de Petri com meio de cultura CPG (caseína hidrolisada 1 g, peptona 10 g,
6 glicose 5 g, agar 17 g, água destilada 1000 mL, pH 7.0) pela técnica de pour-plate.

7 Alíquotas de 150 μ L do sobrenadante concentrado, filtrados em membrana de
8 nitrato celulose (milipore, 0.22 μ m) foram adicionadas aos poços. No poço controle
9 foi adicionado somente caldo nutriente com cobre estéril. As placas foram incubadas
10 por 24 h a 28 °C. A leitura foi realizada através da média dos halos de inibição (mm).

11

12 2.6 Avaliação da Atividade Antibiótica *in vitro*

13 A atividade antibiótica da fração bruta FD foi testada pelo método de difusão
14 em disco de 6 mm de diâmetro (Laborclin[®]), impregnados com 500 ug/disco. O
15 inóculo da cepa patogênica foi obtido a partir de cultura em fase exponencial a uma
16 concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ (D.O.= 0.1; λ = 590 nm) e inoculado em superfície
17 com *swab* em placa de Petri com meio CPG (caseína hidrolisada 1 g, peptona 10 g,
18 glucose 5 g, agar 17 g, água destilada 1000 mL, pH 7.0).

19

20 2.6.1 Ensaio de Atividade Antibiótica das Frações Obtidas na CLV

21 Para determinar quantitativamente a atividade antibiótica das frações obtidas
22 no item 2.3, foram testadas todas as frações pelo método de difusão usando disco
23 de antibiograma de 6 mm de diâmetro (Laborclin[®]), impregnados com 250 μ g e 500
24 ug em duplicata. O inóculo da cepa patogênica foi obtido a partir de cultura em fase

1 exponencial a uma suspensão celular de 10^8 UFC mL⁻¹ (D.O.= 0.1; λ = 590 nm) e
2 inoculado em superfície com *swab* em placa de Petri com meio CPG. As placas
3 foram incubadas por 24 h a 28 °C. A leitura foi realizada através da média dos halos
4 de inibição (mm).

6 2.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

7 A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em
8 placas de cultura de células com 96 poços. O desenho experimental foi de 10
9 concentrações da fração F4A com diluição de 1:2 partindo de 500 µg até 0.97 µg,
10 sendo que em cada poço foi adicionado 100 µL de cada diluição e 100 µL da
11 suspensão de *P. carotovorum* 10^8 UFC mL⁻¹ em triplicata. Foram incluídos, um
12 controle negativo com somente caldo CPG + água destilada estéril, um controle
13 positivo (caldo CPG + suspensão de 10^8 UFC mL⁻¹ da bactéria fitopatogênica), e um
14 controle de esterilidade da fração (caldo CPG + F4A).

15 As placas foram incubadas por 24 h a 28 °C. A leitura foi realizada em
16 espectrofotômetro (ASYS-UVM 340 λ = 590 nm). Para avaliação da viabilidade
17 celular foram adicionados 10 µL de uma solução de cloreto de 2, 3, 5-trifenil
18 tetrazólio (TTC) a 1% e incubada por 40 min a 28°C. A leitura foi realizada pela
19 alteração da cor. Foi considerada sensível (-) na ausência de cor e resistente (+) na
20 presença de coloração rosa-avermelhada.

21 O mesmo procedimento foi realizado para o composto semi-purificado
22 fenazina-1-carboxiamida nas concentrações de 700 a 1.36 µg em uma diluição 1:2,
23 valores baseados no resultado da CIM da F4A, considerando que não foi possível a

1 realização de teste de disco devido à incapacidade da fenazina-1-carboxiamida de
2 se difundir em agar.

3

4 *2.7 Ensaios em Casa de Vegetação*

5 Foram realizados três experimentos sendo que em todos eles foram usados
6 sementes de tomate Santa Clara, as quais foram semeadas em substrato comercial,
7 acondicionadas em bandejas de isopor e transplantadas aos 30 dias. As plantas
8 foram mantidas em casa de vegetação e regadas com água de torneira conforme
9 necessidade.

10 No primeiro experimento, as mudas foram acondicionadas em vasos de 2 L e
11 mantidas por 60 dias após o transplante em condições controladas (26 ± 2 °C,
12 fotoperíodo de 10 h noite e 14 horas dia). Foram avaliadas três concentrações da
13 F4A, 7, 70 e 700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ baseadas no valor encontrado no teste de CIM. O
14 delineamento experimental foi de blocos casualizados em esquema fatorial de 2x3 (2
15 tempos de aplicação dos compostos: preventivo e curativo e 3 concentrações dos
16 compostos) com 5 repetições. O controle positivo foi inoculado com suspensão
17 bacteriana do patógeno, enquanto o controle negativo recebeu apenas água
18 destilada.

19 No tratamento preventivo as mudas foram pulverizadas com os composto (1
20 mL por planta) nas concentrações definidas. Após 24 horas, as raízes secundárias
21 foram feridas com bisturi e infectadas por imersão permanecendo aproximadamente
22 1 min na suspensão de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* a 10^8 UFC mL^{-1} . No
23 tratamento curativo, as mudas foram inoculadas primeiramente com a suspensão
24 bacteriana e posteriormente pulverizadas com os compostos.

1 O segundo experimento teve o mesmo desenho experimental e foi conduzido
2 nas mesmas condições descritas acima. As mudas foram acondicionadas em sacos
3 plásticos de 3 L, e o experimento foi conduzido por 60 dias após o transplante das
4 mudas.

5 No terceiro experimento as mudas foram acondicionadas em vasos de 8 L e
6 mantidas em casa de vegetação por 120 dias após o transplante das mudas, a
7 temperatura ambiente sem controle de temperatura (mínima de 16 °C e máxima de
8 38 °C). O delineamento experimental foi de blocos casualizados em esquema fatorial
9 2 x 2 (aplicação preventiva e curativa dos compostos e 3 concentrações dos
10 compostos) com 6 repetições. O controle positivo foi inoculado com a suspensão
11 bacteriana do patógeno (10^8 UFC mL⁻¹), enquanto o controle negativo recebeu
12 apenas água destilada estéril.

13 No tratamento preventivo as mudas foram pulverizadas com os composto (1
14 mL por planta) nas concentrações definidas. Após 24 horas, as raízes secundárias
15 foram feridas com bisturi e infectadas por imersão permanecendo aproximadamente
16 1 min na suspensão de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* a 10^8 UFC mL⁻¹. No
17 tratamento curativo, as mudas foram inoculadas primeiramente com a suspensão
18 bacteriana e posteriormente pulverizadas com os compostos. Paralelamente, foram
19 conduzidos tratamentos comparativos onde as plantas foram apenas pulverizadas
20 pelos compostos, sem a inoculação do patógeno com o objetivo de avaliar o efeito
21 dos compostos no desenvolvimento da planta e produtividade. Os dados de altura,
22 peso seco e produtividade foram submetidos ao Teste de Tukey 0.5% de
23 probabilidade de erro.

24

1 2.7.1 Avaliação da Doença

2 As mudas foram observadas semanalmente quanto ao desenvolvimento da
3 doença e aparecimento dos sintomas (escurecimento do lenho e apodrecimento da
4 medula), avaliando a capacidade do composto em controlar a doença.

5 As porcentagens de plantas sintomáticas e mortas foram analisadas com o
6 teste de Qui-quadrado com análise de aderência.

7

8 2.7.1.1 Isolamento Bacteriano

9 No segundo experimento, foi realizado o isolamento do patógeno *P.*
10 *carotovorum* subsp. *carotovorum* em meio de cultura CPG para avaliação da
11 presença ou ausência em cada tratamento, para se constatar a ação da antibiótica
12 dos compostos.

13 Para tanto, foi coletado 10 cm da base do caule, macerado em solução salina
14 0.8%, diluído a 10^{-1} e uma alíquota de 50 μ L foi plaqueada com auxílio de alça de
15 Drigalski.

16 A avaliação foi realizada após 48 horas de incubação a 28 °C mediante
17 observação de presença ou ausência de colônias típicas.

18

19 2.7.1.2 Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura

20 A avaliação do efeito do composto na morfologia celular de *P. carotovorum*
21 subsp. *carotovorum* foi realizada após 4 tempos de incubação (0, 30 min, 1:30 h e 3
22 h). Como controles foram utilizados apenas (cultura celular + caldo CPG). As
23 amostras continham alíquotas de 100 μ L da fração na CIM, em 2 repetições onde o
24 T0 foi o tratamento controle com água destilada estéril, adicionada em tubos

1 contendo 900 μL de caldo CPG inoculado com 10^8 UFC mL^{-1} do fitopatógeno a 28
2 $^{\circ}\text{C}$ com agitação horizontal a 100 rpm.

3 Alíquotas de 20 μL dos tratamentos foram transferidas para lâminas de vidro
4 previamente revestidas com poli-L-lisina e colocadas em estufa a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h para
5 secagem. Em seguida, as lâminas foram fixadas em uma solução contendo 2.5% de
6 glutaraldeído, em tampão fosfato 0.1 M (pH 7.2) por um período de 24 h sob
7 refrigeração. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato (0.1 M,
8 pH 7.2) e pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão
9 fosfato por 1 h. As amostras foram desidratadas em etanol nas concentrações de 70,
10 80, 90 e 100%, e posteriormente secas ao ponto crítico de CO_2 (BALTEC CPD 030
11 Critical Point Dryer). Após a secagem, as lâminas foram revestidas com ouro
12 (BALTEC SDC 050 Sputter Coater), e finalmente observadas sob microscópio
13 eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

14 Foram avaliadas mudanças morfológicas nas estruturas celulares bacterianas,
15 principalmente lise celular.

16

17 *2.7.2 Indução do Desenvolvimento Vegetal*

18 Para avaliação da capacidade do composto fenazina-1-carboxiamida em
19 induzir o desenvolvimento nas plantas foi conduzido dois experimentos. O desenho
20 experimental foi de blocos casualizados em esquema fatorial 2x3, no segundo
21 experimento, e 2x2 no terceiro (2 tempos de aplicação dos compostos: preventivo e
22 curativo e 2 concentrações do composto) com 5 repetições. As concentrações
23 utilizadas foram: 3.5, 35 e 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no segundo experimento e 3.5 e 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$
24 no terceiro experimento. Valores escolhidos de acordo com observação em

1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD) quando constatado que o composto
2 fenazina-1-carboxiamida está presente na proporção de 50% da fração F4A.

3 Foi realizado o tratamento comparativo com o indutor de resistência comercial
4 acibenzolar-S-metil, ASM [Bion® 50WG (0.5 g L⁻¹)] de acordo com as orientações do
5 fabricante diluído em água e aplicado pela rega 24 horas antes da infecção pelo
6 patógeno.

7 Para avaliação da promoção do desenvolvimento vegetal, no primeiro
8 experimento após 60 dias, no final do experimento foi avaliado o peso seco da parte
9 aérea e da raiz das plantas, após secagem em estufa a 50 °C. Os dados de altura e
10 peso seco foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).
11 No segundo experimento, os dados não apresentaram uma distribuição normal e
12 precisaram ser transformados (raiz de $Y+0.5$).

13

14 *2.7.2.1 Análises Bioquímicas*

15 As análises bioquímicas foram realizadas para avaliação da indução de
16 resistência provocada pelo composto fenazina-1-carboxiamida. Para tanto, foi
17 realizado um experimento em casa de vegetação do laboratório de Genética de
18 Fungos da Universidade Estadual de Londrina UEL, Londrina, PR. As mudas foram
19 acondicionadas em vasos de 2 L e o experimento foi conduzido por 7 dias com
20 controle de temperatura (35 ± 2 °C), com uma só aplicação do composto nas
21 concentrações de: 3.5 e 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram realizadas cinco coletas em diferentes
22 tempos, com cinco repetições em cada tempo/tratamento.

23 Foram avaliadas plantas inoculadas e plantas não inoculadas com o patógeno.
24 As plantas inoculadas receberam aplicação dos tratamentos e após 24 hrs foram

1 inoculadas com a suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹) através da imersão das
2 raízes secundárias previamente lesionadas com bisturi. As plantas não inoculadas
3 receberam apenas aplicação dos compostos e suas raízes, também lesionadas,
4 foram imersas em água destilada estéril.

5 Também foi realizado o tratamento com o indutor de resistência comercial
6 acibenzolar-S-metil, (Bion[®] 50WG) na dose 0.5 g L⁻¹ de acordo com as orientações
7 do fabricante diluído em água e aplicado pela rega 24 hrs antes da infecção pelo
8 patógeno, além do controle negativo que recebeu apenas água destilada.

9

10 *2.7.2.1.1 Coleta de amostras*

11 A parte aérea das plantas (total de 3 gramas) foi coletada e armazenada a -20
12 °C até a extração das proteínas. As coletas das plantas não inoculadas ocorreram
13 nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos. As plantas
14 inoculadas foram coletadas nos tempos 1, 3 e 5 dias após a inoculação (3, 5 e 7 dias
15 após a aplicação dos tratamentos) (Cavalcanti et al., 2007).

16

17 *2.7.2.1.2 Obtenção dos extratos protéicos*

18 As amostras coletadas foram maceradas com auxílio de almofariz em
19 nitrogênio líquido com adição de 150 mg de PVP (poli-vinil-pirrolidona). Uma porção
20 de 200 mg do macerado foi homogeneizada em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio
21 10 mM (pH 6.0) com 0.1 mM EDTA para peroxidase, MacIlvane 120 mM (pH 6.5)
22 para fenoloxidase e Tris-EDTA 0.5 M (pH 8.5) para fenilalanina-amônia-liase. O
23 homogenato foi centrifugado a 12000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante obtido
24 foi considerado o extrato enzimático (Araújo e Menezes, 2009).

1

2 *2.7.2.1.3 Teor de proteína total*

3 O teor de proteína total foi avaliado pelo método de Bradford (1976). Foi
4 utilizado 10 µL do extrato enzimático e adicionado 200 µL do reagente de Bradford.
5 Após 5 min realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. A
6 concentração de proteínas foi expressa em termos equivalentes a mg de albumina
7 de soro bovino (BSA) por mL de amostra (mg proteína mL⁻¹).

8

9 *2.7.2.1.4 Determinação da atividade de peroxidase de guaiacol*

10 A atividade de peroxidase de guaiacol foi determinada pela adição de 100 µL
11 de extrato enzimático adicionado 2.8 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH
12 6.0), 50 µL de uma solução de guaiacol 0.5% e 50 µL de peróxido de hidrogênio 3%
13 para reação das amostras. Para o branco da amostra foi utilizado 2.85 mL do
14 tampão, 50 µL da solução de guaiacol adicionado a 100 µL do extrato. Para o branco
15 do substrato foi utilizado 2.9 mL do tampão, 50 µL da solução de guaiacol e 50 µL de
16 peróxido de hidrogênio. Após a incubação em banho-Maria a 30 °C por 30 min, a
17 absorbância foi medida a 480 nm de acordo com a metodologia de Urbanek et al.,
18 (1991) adaptada, foram realizadas duplicatas das amostras para leitura da
19 absorbância. Uma unidade de peroxidase foi definida como a quantidade de enzima
20 necessária para liberar 1µmol de guaiacol/min dentro das condições do ensaio.
21 Sendo que o coeficiente de extinção molar (e) do substrato é de 25.5 cm²/µmol.
22 Utilizando a equação:

$$23 \quad U/mL = \frac{(A_{amostra} - A_{branco}) / \text{min} \cdot 4 \cdot V_t \text{ (fator de diluição)}}{e \cdot V_s}$$

24 Onde Vt é volume final da reação, que foi 3 mL e Vs o volume da amostra.

1

2 *2.7.2.1.5 Determinação da atividade de polifenoloxidase*

3 A atividade de polifenoloxidase foi determinada pela adição de 100 µL do
 4 extrato enzimático a 600 µL de água destilada estéril, 150 µL de tampão MacIlvaine
 5 120 mM (pH 6.5) e 150 µL do substrato DMP (2,6-dimetoxifenol) 10 mM. Para o
 6 branco da amostra foram utilizados 750 µL da água, 150 µL do tampão e 100 µL de
 7 extrato enzimático. Para o branco do substrato foram utilizados 700 µL da água, 150
 8 µL do tampão e 150 µL do substrato. Após incubação a 45°C em banho-Maria por
 9 30 min, a absorbância foi medida a 468 nm em duplicata, de acordo com a
 10 metodologia de Barbosa et.al., (1996) com modificações. Uma unidade de
 11 polifenoloxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1
 12 M de DMP/min dentro das condições do ensaio. Sendo que o coeficiente de extinção
 13 molar (e) do substrato é de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Utilizando a equação:

$$14 \quad U/mL = \frac{(A_{\text{amostra}} - (A_{\text{brancosubstrato}} + A_{\text{brancoenzima}}))}{e} \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times DF \times 1000$$

15 Onde V é volume da amostra, DF é o fator de diluição e t o tempo de
 16 incubação. A atividade foi relacionada ao Bradford e obtida em U/mg.

17

18 *2.7.2.1.6 Determinação da atividade de fenilalanina amônia- liase*

19 A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela adição de 100 µL
 20 de extrato enzimático a 2.4 mL de tampão Tris-EDTA 0.5 M (pH 8.5) e 500 µL de
 21 uma solução de L-fenilalanina (300 µM). Para o branco da amostra foram utilizados
 22 2.9 mL do tampão e 100 µL do extrato. Para o branco do substrato foram utilizados
 23 500 µL do substrato e 2.5 mL do tampão. Após a incubação a 40 °C em banho-Maria
 24 por 60 min, a absorbância foi medida a 290 nm em duplicata baseado em Mori et al.,

1 (2001). Uma unidade de fenilalanina foi definida como a quantidade de enzima
2 necessária para liberar 1 mM de L-fenilalanina/min dentro das condições do ensaio.
3 Sendo que o coeficiente de extinção molar (ϵ) do substrato é de $10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
4 Utilizando a equação:

$$5 \quad \text{U/mL} = \frac{(A_{\text{amostra}} - (A_{\text{brancosubstrato}} + A_{\text{brancoenzima}}))}{\epsilon} \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times \text{DF} \times 1000$$

6 Onde V é volume da amostra, DF é o fator de diluição e t o tempo de
7 incubação. A atividade foi relacionada ao Bradford e obtida em U/mg.

8

9 *2.8. Avaliação da Produtividade*

10 Para avaliar os aspectos de produção e qualidade dos frutos de tomateiro, a
11 colheita foi realizada manualmente aos 60 dias após o tratamento. As características
12 relacionadas avaliadas foram: produção média de frutos colhidos para os diferentes
13 tratamentos e peso de todos os frutos colhidos por tratamento, em termos médios,
14 expresso em gramas.

15 Os valores obtidos com os dados de produção foram submetidos a análise de
16 variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0.5%.

17

18

19 **3 RESULTADOS**

20

21 O rendimento dos metabólitos extraídos com diclorometano (FD) foi de 0.375 g
22 por litro de meio cultivado. A fração F4A foi a que apresentou melhores resultados
23 de ação antibiótica e teve rendimento de 25 mg por 500 mg de FD. O composto
24 fenazina-1-carboxiamida (FDFen01) foi de 14.6 mg por 500 mg de FD.

1 O sobrenadante do cultivo concentrado apresentou halo de inibição de 32 ± 0.5
2 mm e a FD de 35 ± 1.5 mm na concentração de $500 \mu\text{g } 10 \mu\text{L}^{-1}$.

3 Dentre as frações obtidas na CLV apenas a fração 4A apresentou atividade
4 antimicrobiana, com halos de inibição do crescimento do patógeno de 21 ± 1 mm e
5 25 ± 1.5 mm, nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{disco}$, respectivamente (Tabela 1).

6 A CIM, da F4A foi de $7.81 \mu\text{g mL}^{-1}$, a fenazina-1-carboxiamida não apresentou
7 atividade antibiótica para *P. carotovorum* (Tabela 1).

8 A fração F4A quando aplicada preventivamente se mostrou mais eficiente, no
9 controle da podridão mole do tomateiro do que o Bion[®], pois 100% das plantas
10 sobreviveram contra 80% do Bion[®], diferentes estatisticamente pelo teste Qui-
11 quadrado ($X^2 = 58.01$; $p < 0.0001$) (Tabela 2).

12 No terceiro experimento foi observada uma média de 60% do desenvolvimento
13 da doença nos tratamentos controles, enquanto nas plantas tratadas não foram
14 observados sintomas da doença, diferindo estatisticamente pelo teste do Qui-
15 quadrado ($X^2 = 58.01$; $p < 0.0001$).

16 Nos testes de presença ou ausência de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, as
17 plantas infectadas experimentalmente apresentaram 100% de infecção assim como
18 as tratadas com DMSO, indicando que o solvente não combate o patógeno (Tabela
19 3).

20 Mesmo com a presença de bactéria em algumas plantas não foi observado
21 nenhum sintoma da doença nas plantas tratadas preventivamente com a F4A e
22 fenazina-1-carboxiamida. Enquanto nos tratamentos com fração antibiótica a
23 presença variou de 20 a 40% tanto no tratamento preventivo quanto no curativo,

1 sendo que na concentração curativa de 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não houve crescimento do
2 patógeno (Tabela 3).

3 Para o composto fenazina-1-carboxiamida, a presença do patógeno foi
4 observada em três tratamentos. Nos tratamentos curativos nas concentrações de 35
5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$, assim como no tratamento preventivo na concentração de
6 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ houve ausência de crescimento.

7 Na MEV foram observadas, após a incubação de 3:00 h, células de *P.*
8 *carotovorum* subsp. *carotovorum* mortas e defromadas, quando comparada aos
9 controles (Figura 2). Nos outros tempos de incubação as células continuavam
10 intactas, bem como seus respectivos controles.

11 Nos três experimentos, as plantas tratadas apresentaram um maior
12 desenvolvimento quando comparada com o controle. No primeiro experimento, as
13 plantas do tratamento preventivo na concentração de 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram
14 significativamente maiores (Figura 3A).

15 Assim como a biomassa seca da parte aérea (Figura 3B) e biomassa seca da
16 raiz (Figura 3C) que foram maiores no tratamento preventivo na concentração de 70
17 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

18 Já no segundo experimento, os dados estatísticos das alturas das plantas
19 mostraram que o composto fenazina-1-carboxiamida é mais eficiente na promoção
20 do crescimento da planta (Figura 4).

21 Enquanto no terceiro experimento, nos tratamentos nos quais as plantas foram
22 inoculadas (Figura 5A), o tratamento curativo com F4A na concentração de 75 μg
23 teve os resultados mais significativos, já nas plantas não inoculadas esse resultado

1 foi encontrado no tratamento com o composto fenazina-1-carboxiamida na
2 concentração de 37 μg (Figura 5B).

3 O aumento da atividade de peroxidase foi observada após 5 dias da aplicação
4 dos tratamentos nas plantas inoculadas pré-tratadas acompanhadas do controle
5 Bion[®]. Nas plantas não inoculadas o controle Bion[®] provocou aumento da atividade
6 enzimática já no terceiro dia após a aplicação do tratamento enquanto as plantas
7 tratadas com o composto fenazina-1-carboxiamida provocaram maior aumento no
8 quinto dia após a aplicação (Figura 6A).

9 O aumento da atividade de polifenoloxidase foi observada a partir do primeiro
10 dia após a aplicação do tratamento na concentração de 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mantendo-se os
11 níveis até o quinto dia. Nas plantas do controle positivo, apenas inoculadas com o
12 patógeno, não foi observada atividade enzimática para polifenoloxidase (Figura 6B).

13 Nas plantas inoculadas, o controle Bion[®] provocou aumento da atividade
14 enzimática apenas no terceiro ao quinto dia após a aplicação do tratamento,
15 enquanto as plantas tratadas com o composto fenazina-1-carboxiamida nas
16 concentrações de 3.5 e 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ provocaram aumento no primeiro dia com queda
17 até o terceiro dia após a aplicação.

18 O aumento da atividade de fenilalanina-amônia-liase foi observado no primeiro
19 e no quinto dia após a aplicação do tratamento com o composto fenazina-1-
20 carboxiamida na concentração de 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas plantas posteriormente infectadas.
21 O controle positivo teve ligeiro aumento em todos os dias de coleta.

22 Nas plantas não inoculadas, o controle Bion[®] provocou aumento da atividade
23 enzimática no sétimo dia após a aplicação do tratamento acompanhado das plantas

1 tratadas na concentração de $37 \mu\text{g mL}^{-1}$, que só não provocou esse aumento no
2 quinto dia após a aplicação (Figura 6C).

3 A produção total de frutos foi maior nos tratamentos em que as plantas
4 receberam a aplicação do composto fenazina-1-carboxiamida na concentração de
5 $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ com aumento médio de 3 frutos por planta comparado aos controles
6 (Figura 7A).

7 Enquanto nas plantas pré-tratadas e inoculadas o tratamento com a fração F4A
8 na concentração de $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi o que apresentou o resultado mais significativo,
9 acompanhados do pós-tratamento também com essa fração na mesma
10 concentração assim como na concentração de $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 7B).

11 Com relação ao peso médio dos frutos não foi observada diferença entre as
12 plantas que foram tratadas e não inoculadas (Figura 7C). Enquanto nas plantas
13 tratadas os resultados mais significativos foram nas pré-tratadas, nas plantas que
14 receberam a fração F4A na concentração de $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ e das que receberam
15 aplicação do composto fenazina-1-carboxiamida na concentração de $37 \mu\text{g mL}^{-1}$,
16 com aumento médio de 10 gramas nesses tratamentos (Figura 7D).

17

18

19 **4 DISCUSSÃO**

20 Os testes de atividade antibiótica constataram a ação da F4A no controle do
21 micro-organismo fitopatogênico *P. carotovora* subsp. *carotovorum*, comprovando sua
22 ação de biocontrole, como Byrne, et al. (2005) que constataram a ação de
23 *Pseudomonas* sp. como agente de controle biológico de *X. campestris* pv.
24 *vesicatoria* e *X. vesicatoria* em tomate.

1 Resultados como de Oliveira et al (2011) que utilizando um composto
2 secundário do metabolismo de *Pseudomonas* sp. (LV) controlaram *X. axonopodis*
3 pv.*citri* cepa 306, sinônimo *X. citri* subsp.*citri*, corroboram com os resultados do
4 presente trabalho.

5 Através da avaliação ultraestrutural por MEV foi possível observar uma
6 desestruturação da matriz celular bacteriana, possível morte já que em testes *in vitro*
7 realizados com a fração semi-purificada F4A foi observada a inibição do crescimento
8 do patógeno sugerindo a ação biocida.

9 Já o composto fenazina-1-carboxiamida não mostrou atividade no controle do
10 crescimento bacteriano *in vitro* diferentemente da fração F4A que apresenta uma
11 concentração inibitória mínima frente ao fitopatógeno, diferindo de outros trabalhos
12 que obtiveram resultados positivos do uso de fenazina-1-carboxilíca como antibiótico
13 (Valente et al., 2011); e antifúngica (Cartwright et al., 1995). Enquanto a fração F4A
14 apresenta um composto antibiótico em sua composição, ainda não elucidado
15 totalmente.

16 Nos ensaios em casa de vegetação pode-se constatar a efetividade da fração
17 F4A no controle da doença, mantendo a planta saudável e com uma menor
18 presença da bactéria na planta, o que foi constatado através do crescimento em
19 placa até mesmo nos tratamentos preventivos. Keel et al. (1992) confirmam o papel
20 dos antibióticos de origem bacteriana no controle biológico de patógenos habitantes
21 do solo correlacionando a inibição antibiótica do patógeno *in vitro* e a supressão da
22 doença *in vivo*.

23 Nessas mesmas condições, o composto fenazina-1-carboxiamida também foi
24 eficiente no controle da doença nas plantas, tanto no tratamento preventivo quanto

1 no curativo, resultado similar ao encontrado no tratamento controle com Bion[®],
2 presumindo alguma ação provocada na planta e não sobre o patógeno.

3 A piocianina (PYO), um composto de fenazina, é conhecida por atuar como um
4 indutor de resistência sistêmica (ISR) nas plantas. ISR é mediada pelo etileno e
5 jasmonato e as vias de transdução de sinal podem ser desencadeadas (Pahm, et al.
6 2003). Como constatado por DE Vleesschauwer et al. (2006) que inocularam *P.*
7 *aeruginosa* em plantas de arroz e provocaram ISR, já que após a perda induzida de
8 produção de PYO resultou na perda da ISR frente ao fungo.

9 Bem como o metabólito secundário Pioquelina produzida por *P. aeruginosa*
10 7NSK2 por Audenaert et al. (2002) que induziram a resistência a *Botrytis cinerea* em
11 tomate, provada através da construção de um mutante piocianina-negativo. Nesse
12 presente trabalho uma indução sistêmica é fundamentada no fato de ser expressa
13 em locais não expostos diretamente ao agente indutor.

14 Destacando-se o fato da fração F4A apresentar em sua composição
15 aproximadamente 50% do composto fenazina-1-carboxiamida, e relacionando essa
16 informação aos dados obtidos com altura das plantas, mostram que ambos os
17 produtos, F4A e fenazina-1-carboxiamida, são eficientes no controle da doença e na
18 estimulação do desenvolvimento vegetal.

19 Quando avaliamos os resultados do terceiro experimento onde as plantas que
20 foram tratadas apenas com o composto fenazina-1-carboxiamida, sem uma posterior
21 inoculação, apresentaram resultados mais significativos, pode-se considerar que
22 este composto que possui ação na estimulação do crescimento.

23 Foi observada a incidência de outras doenças nas plantas do terceiro
24 experimento, por outro lado três das cinco plantas tratadas com o composto

1 fenazina-1-carboxiamida na concentração de $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ continuaram sadias até o
2 fim do experimento.

3 Considerando produções de larga escala em campo, em unidades de tonelada,
4 o aumento de produtividade, tanto em número de frutos quanto em peso, encontrado
5 nesse trabalho, tem futuros promissores para a agricultura.

6 Quanto à atividade enzimática o aumento significativo pode estar relacionado
7 com a incidência da doença, o desenvolvimento da planta e a produção dos frutos.

8 Observa-se que o comportamento das enzimas nos diferentes tratamentos foi
9 similar, sendo maior nos tratamentos inoculados, levando-se em conta que as
10 plantas são capazes de ativar rapidamente, mas de forma orquestrada, diferentes
11 mecanismos bioquímicos de defesa associados com o metabolismo secundário após
12 a infecção por patógenos (Pereira et al., 2009).

13 Mudanças na atividade destas enzimas tem sido frequentemente
14 correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes
15 patossistemas (Viecelli et al., 2010).

16 As plantas tratadas com o composto fenazina-1-carboxiamida apresentaram
17 maior atividade de peroxidase e este mesmo tratamento foi o que demonstrou uma
18 melhora na produção de frutos, incitando o seu possível envolvimento nos
19 mecanismos de indução de resistência.

20 As peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos
21 grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina.
22 Esse polímero, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na
23 parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à
24 penetração do patógeno. (Cavalcanti et al., 2005).

1 O aumento da atividade enzimática também foi observada nas plantas do
2 controle Bion[®] Vigo-Schultz, (2008) verificou que sob efeito de acibenzolar-S-metil e
3 piraclostrobina, as plantas de feijão vagem, mostraram maiores atividades da
4 polifenoloxidase e peroxidase, sugerindo seu envolvimento nos mecanismos de
5 indução de resistência ao cretamento bacteriano comum, semelhante aos
6 resultados aqui observados para tomateiro.

7 A atividade de enzimas oxidativas como peroxidases e polifenoloxidases tem
8 sido bastante estudada em plantas como parte dos mecanismos de defesas
9 induzidas (Sánchez et al., 2000; Nojosa et al., 2003).

10 Muitos autores relacionam a fenilalanina amônia-liase com os mecanismos de
11 proteção e adaptação das plantas. A atividade dessa enzima está diretamente
12 relacionada com a resistência a fatores tanto bióticos como abióticos, interferindo em
13 vias metabólicas vegetais (Rivero, et al., 2001).

14 A resistência induzida em plantas de tomateiro pulverizadas com Bion[®] e
15 Ecolife[®], realizada por Cavalcante et al. (2006), foi evidenciada pelo aumento da
16 atividade de peroxidases (POX) e oxidases de polifenóis (PPO), iniciado nas
17 primeiras horas após as pulverizações, continuando até 12 dias de avaliação.

18 Já Sahhafi et al. (2012) usaram a atividade de peroxidase para avaliar
19 cultivares resistentes comparando-a com a expressa em plantas suscetíveis.

20 Araújo e Carvalho (2009) observaram que em ensaio conduzido com tomate
21 cultivar Santa Clara, o tratamento biológico com *Bacillus subtilis* influenciou o
22 crescimento das plantas em variáveis como produção de biomassa da parte aérea,
23 massa total de frutos e número de frutos maduros, quando comparado com a
24 testemunha, o mesmo foi observado neste trabalho.

1

2 **5 CONCLUSÃO**

3 Esses resultados sugerem que o controle da *P. catovororum* subsp. *carotovorum*
4 com os compostos do metabolismo secundário bacteriano de *P. aeruginosa* (cepa
5 LV) podem ser considerado uma importante ferramenta no manejo deste
6 fitopatógeno.

7 A fração semi-purificada F4A mostrou uma ação antibiótica tanto *in vitro*,
8 constatada pelos testes de atividade antibiótica, quanto *in vivo*, no controle da
9 doença e suprimindo os sintomas nos ensaios em casa de vegetação.

10 Sugere-se que o composto fenazina-1-carboxiamida tenha ação na indução de
11 crescimento em plantas, pelo aumento observado do desenvolvimento vegetal e
12 produção de frutos. As atividades enzimáticas aumentadas por esse composto
13 podem sugerir também uma indução de resistência através de alterações no
14 metabolismo, além de mecanismos que deverão ser elucidados futuramente.

15

16 **6 AGRADECIMENTOS**

17 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e
18 ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que
19 possibilitaram a realização deste estudo concedendo bolsas de estudos para PIBIC,
20 mestrado e doutorado.

21

22 **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 ARAUJO, F. F., MENEZES, A., 2009. Indução de resistência a doenças foliares em
2 tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-
3 Metil). Summa Phytopathol. 35, 3,169-172.
- 4 AUDENAERT, K., PATTERY, T., CORNELIS, P., HOFTE, M., 2002. Induction of
5 systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa*
6 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Molecular Plant-
7 Microbe Interactions. 15, 1147-1156.
- 8 BARRA, V. R., ROMEIRO, R. DA S., GARCIA, F. A. DE O., MOURA, A. B., SILVA,
9 H. S.A., MENDONÇA, H.L., HALFELD-VIEIRA, B.A., 2009. Antagonismo direto
10 e biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro pelo uso de procariontas. Pesq.
11 Agropec. Bras., 44, 3, 327-330.
- 12 BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; St HARDY, G.E., 1996. Veratryl alcohol as
13 inducer of lacase by ascomycete, *Botryosphaeria* sp, when screened on
14 polymeric dye Poly R-478. Lett. Appl. Microbiol., 23, 93-96.
- 15 BRADFORD, M., 1976. Analytical Biochemistry. 72, 248-254.
- 16 BYRNE, J.M., DIANESE, A.C., JIA, P., CAMPBELL, H.L., CUPPELS, D.A.,
17 LOUWS, F.J., MILLER, S.A., JONES, J.B. WILSON, M., 2005. Biological control
18 of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North
19 America. Biological Control 32, 408–418.
- 20 CARTWRIGHT, D. K.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M., 1995. Pyrrolnitrin and
21 phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B., a biocontrol agent
22 of *Rhizoctonia solani*, Applied Microbiology and Biotechnology 43, 211-216.
23

- 1 CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JÚNIOR, P.M.,
2 COSTA, J.C.B. & SOUZA, R.M., 2006. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na
3 indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana
4 (*Xanthomonas vesicatoria*). Fitopatologia Brasileira 31, 372-380.
- 5 CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STARGARLIN, J. R., 2005. Aspectos
6 bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI
7 PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R.
8 S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba:
9 FEALQ, 85-124.
- 10 CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., CARVALHO, C.P.S., SILVEIRA, J.A.G.,
11 OLIVEIRA, J.T.A., 2007. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicioso*
12 mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas*
13 *vesicatoria*. Crop Protection 26, 729-738.
- 14 DE VLEESSCHAUWER D., CORNELIS P., HÖFTE M., 2006. Redox-active
15 pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic
16 resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani*
17 susceptibility in rice. Molecular Plant-Microbe Interactions 19, 1406–1419.
- 18 DONG YH; ZHANG XF; XU JL; ZHANG LH. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis*
19 silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism,
20 signal interference. Applied and Environmental Microbiology 70: 954-960.
- 21 DYE, D. W., 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The “carotovora”
22 group. New Zealand Journal of Science 12, 81-97.
- 23 HAUBEN, L., MOORE, E. R., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT,
24 J., VERDONCK, L. ; SWINGS, J., 1998. Phylogenetic position of

- 1 phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Systematic and Applied
2 Microbiology 21, 384-397.
- 3 KEEL, C., SCHNIDER, U., MAURHOFER, M., VOISARD, C., LAVILLE, J., BURGER,
4 U., WIRHNER, P., HAAS, D., DÉFAGO, G., 1992. Suppression of Root
5 diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the Bacterial
6 Secondary Metabolite 2,4-Diacetylphloroglucinol. Molecular Plant-Microbe
7 Interactions 5, 1, 4-13.
- 8 LATORRACA A., MARQUES, G. J. G., SOUSA, K. V., FORNÉS, N. S., 2008
9 .Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e
10 efeitos na saúde humana. Com. Ciências Saúde. 19, 4, 365-374.
- 11 MALATHRAKIS, N.E., GOUMAS, D.E., 1987. Bacterial soft rot of tomato in piastic
12 greenhouses in Crete. Ann.appl. Bid. 111, 115-123.
- 13 MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B., ASSIS, S.M.P., GOMES, A.M.A., OLIVEIRA,
14 I.S.; NASCIMENTO, A.R.P., 2001. Diagnose e manejo de fitobacterioses de
15 importância no nordeste brasileiro. In: Michereff, S.J.; Barros, R. (Eds.)
16 Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife. UFRPE, 141-169.
- 17 MARIANO, R. DE L. R., SILVEIRA, E. B. DA, ALVARADO, I. DEL C. M., SILVA, A.
18 M. F., 2005. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros
19 *Pectobacterium* e *Dickeya*. Anais da Academia Pernambucana de Ciência
20 Agronômica2, 121-153.
- 21 MELLO MRF; SILVEIRA EB; VIANA IO; GUERRA ML; MARIANO RLR. 2011. Uso
22 de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa.
23 Horticultura Brasileira 29, 78-83.

- 1 MORI, T., SAKURAI, M., SAKUTA, M., 2001. Effects of conditioned medium on
2 activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin
3 production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. Plant Sci. 160, 355-360.
- 4 NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; AGUILAR, M. A. G., BEZERRA, K. M. T.; ANHERT,
5 D. E., 2003. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de
6 *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*.
7 Fitopatologia Brasileira 28, 148-154.
- 8 OLIVEIRA JÚNIOR, A. G. de, MURATE, L. S., SOUZA, P. B., SPAGO, F. R., LOPES, L. P.,
9 BERANGER, J. P. O., SAN MARTIN, J. A. B., NOGUEIRA, M. A. MELLO, J. C. P.,
10 ANDRADE, C. G. T. J., ANDRADE, G., 2011. Evaluation of the antibiotic activity of
11 extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the
12 *Xanthomonas citripv. citri* 306 strain. Biological Control (Print) 56, 125 - 131.
- 13 PAHM, B., RAN L. X., PIETERSE, C. M. J., VAN LOON, L. C., 2003. Understanding the
14 involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in
15 biocontrol of plant diseases. Can. J. Plant Pathol. 25, 5–9.
- 16 PEREIRA, S. C., RODRIGUES, F. A., CARRÉ-MISSIO, V., OLIVEIRA, M. G. A.,
17 ZAMBOLIM, L., 2009. Efeito da aplicação foliar de silício na resistência à
18 ferrugem e na potencialização da atividade de enzimas de defesa em cafeeiro.
19 Tropical Plant Pathology 34, 4, 223-230.
- 20 RAAIJMAKERS, J. M., VLAMI, M., de SOUZA, J. T., 2002. Antibiotic production by
21 bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek 81, 537-547.
- 22 RAMPAZO, L. G. L., 2004. Avaliação do efeito de agentes biológicos e seus produtos
23 na incidência de lesões de cancro cítrico. Universidade Estadual de Londrina,
24 Dissertação de Mestrado, Londrina, Brasil, p. 59.

- 1 RIVERO, R.M., RUIZ, J.M., GARCÍA, P.C., LÓPEZ-LEFEBRE, L.R, SÁNCHEZ, E.,
2 ROMERO, L., 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of
3 phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160, 315-
4 321.
- 5 ROMEIRO, R. da S., 2005. Bactérias fitopatogênicas. 2.ed. Viçosa:UFV, 417.
- 6 SAHHAFI, S. R., BAGHERI, F., ASSAD, M. T., 2012. Evaluation of some biochemical
7 responses in resistance of fifteen bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes
8 to wheat streak mosaic virus. *Journal of Agricultural Science* 4, 5.
- 9 SÁNCHEZ, E.; SOTO, J. M.; GARCÍA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; RIVERO, R.
10 M.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L., 2000. Phenolic compounds and oxidative
11 metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Journal of Plant*
12 *Physiology* 27, 973-978.
- 13 SEGUI-SIMARRO, J., NUEZ, F., 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and
14 plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole
15 anthers. *Journal of Experimental Botany* 58, 5, 1119–1132.
- 16 SHANMUGAIAH, V., MATHIVANAN, N., VARGHESE, B., 2010. Purification, crystal
17 structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a
18 growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212.
19 *Journal of Applied Microbiology* 108, 703–711.
- 20 URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, H., 1991. Elicitation of
21 defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta*
22 *Physiol. Plant.* 13, 43-50.
- 23 VALENTE, A. M. M. P., SILVA, L. J. DA, VILELA, E. S. D., JUNIO, O. L. F.,
24 GAMBARRA, F., FERREIRA, A. G., BOFFO, E. F., MORAES, L. A. B.,

- 1 PELIZARI, V., MELO, I. S. Atividade antibacteriana do ácido fenazina-1-
2 carboxílico por *Pseudomonas* sp. (Mono49) isolada de *Monostroma* da
3 Antártica. <[http:
4 www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R1883](http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R1883)> Acesso em:
5 19 de março de 2014.
- 6 VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. ,
7 2010. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de
8 micélio de *Pycnoporus sanguineus*. *Summa Phytopathologica* 36, 1, 73-80.
- 9 VIGO-SCHULTZ, S. C., 2008. Avaliação da indução de resistência no controle do
10 crestamento bacteriano comum do feijão vagem. 2008. 78 f. Tese (Doutorado
11 em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas,
12 Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 13 WALDEE, E.L., 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic
14 bacteria. *Iowa State J. Sci.* 19.
- 15 ZAMANIAN, S.; SHAHIDI, G.H.; SAADOUN, I. 2005. First report of antibacterial
16 properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (strain 101) against *Erwinia*
17 *carotovora* subsp. *carotovora* from Iran. *Biotechnology*, 4, 114-120.

18

19 **8 TABELAS E FIGURAS**

20

21 **Tabela 1.** Determinação atividade antibiótica da fase diclorometano (FD) e F4A pelo
22 teste de disco seco e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da
23 fração F4A por microdiluição em caldo LB de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

24

	Disco Difusão/Halo de Inibição do Crescimento			CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	FD ($\mu\text{g}/\text{disco}$)	F4A($\mu\text{g}/\text{disco}$)		F4A	Fenazina
	500	250	500		
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	35 \pm 1.5mm	21 \pm 1 mm	25 \pm 1.5 mm	7.81	N/I

1 *N/I – Não inibiu o crescimento.

2

- 1 **Tabela 2.** Índice de mortalidade de plantas de tomateiro (após 60 dias em casa de
 2 vegetação) tratadas em aplicações curativas ou preventivas com a fração F4A e
 3 inoculadas com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

TRATAMENTOS	MORTE DAS PLANTAS (%)
Controles	
Doentes	60%
Sadias	0%
Bion	20%
Tratamento Preventivo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
7	0%
70	0%
700	0%
Tratamento Curativo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
7	0%
70	80%
700	80%

- 4 Teste Qui-quadrado ($\chi^2 = 58.01$; $p < 0.0001$).

5

6

1 **Tabela 3.** Avaliação da presença/ausência de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*
 2 realizado em plantas inoculadas e tratadas com a fração F4A e fenazina-1-
 3 carboxiamida após 60 dias em casa de vegetação.

4

TRATAMENTO	PRESENÇA (+) AUSÊNCIA (-) de <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Controles	
Sadia	-----
Doente	+++++
DMSO Pré	+++++
DMSO Pós	+++++
BION	-----
Tratamento Preventivo	
F4A ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
7	++++
70	+----
700	++++
Fenazina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
3,5	++++
35	++++
350	-----
Tratamento Curativo	
F4A ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
7	-----
70	+++++
700	+----
Fenazina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
3,5	++++
35	-----
350	-----

5 (+) repetições com presença do patógeno, (-) repetições com ausência do patógeno

6

1 Lista de Figuras

2

3 Figura 2. Efeito da fração F4A ($7.81\mu\text{g mL}^{-1}$) na ultraestrutura de *Pectobacterium*
4 *carotovorum* subsp. *carotovorum* por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
5 Células bacterianas após 30 min. de incubação [células não tratadas (A) e tratadas
6 (B)], células bacterianas após 90 min. de incubação [células não tratadas (C) e
7 tratadas (D)]; células bacterianas após 3 h de incubação [células não tratadas (E) e
8 tratadas (F)].

9

10 Figura 3. Efeito da fração F4A na altura, peso seco de parte aérea e de raiz de
11 plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) após 60 dias do transplante e
12 infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* cultivadas em casa
13 de vegetação em condições controladas. A. Altura da planta (C.V= 19.24%); B. Peso
14 seco parte aérea (C.V= 11.57%); C. Peso seco da raiz (C.V= 5.10%).

15

16 Figura 4. Efeito da fração F4A e fenazina-1- carboxamida na altura de tomateiro
17 (*Solanum lycopersicum*) após 60 dias do transplante e infectadas com
18 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* cultivadas em casa de vegetação
19 em condições controladas. (C.V= 6.61%).

20

21 Figura 5. Efeito da fração F4A e fenazina-1- carboxamida na altura de tomateiro
22 (*Solanum lycopersicum*) após 60 dias do transplante e infectadas com
23 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* cultivadas em casa de vegetação.
24 A. Plantas não infectadas (C.V= 20.24%); B. Plantas infectadas (C.V= 10.68%).

25

1 Figura 6. Atividade enzimática em folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*)
2 tratadas com fenazina-1-carboxamida (3.5 e 37 μ g mL⁻¹) após infecção com
3 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. A. peroxidase; B. polifenoloxidase;
4 C. fenilalanina-amônia-liase. Os dias começaram a ser contados após inoculação do
5 patógeno.(----) não inoculadas; (- - -) inoculadas.

6

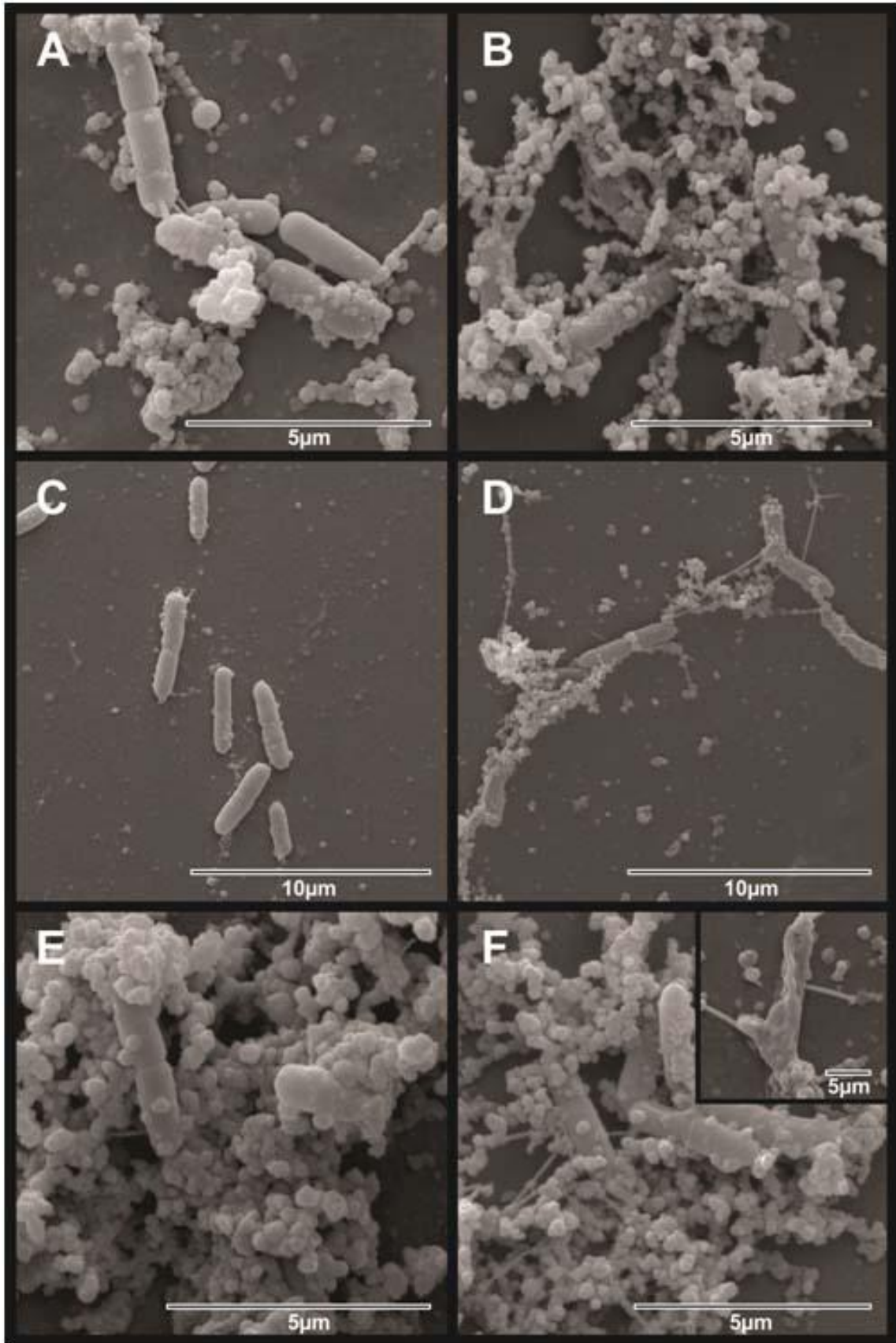
7 Figura 7. Avaliação da produtividade de tomates em plantas tratadas com fenazina-
8 1-carboxamida, e infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
9 aos 60 dias em casa de vegetação. A. número de frutos colhidos em plantas não
10 infectadas (C.V= 38.02%); B. número de frutos colhidos em plantas infectadas (C.V=
11 38.02%).

12

13 Figura 8. Avaliação da produtividade de tomates (g) em plantas tratadas com
14 fenazina-1-carboxamida, e infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp.
15 *carotovorum* aos 60 dias em casa de vegetação. A. número de frutos colhidos em
16 plantas não infectadas (C.V= 6.32%); B. número de frutos colhidos em plantas
17 infectadas (C.V= 3.87%).

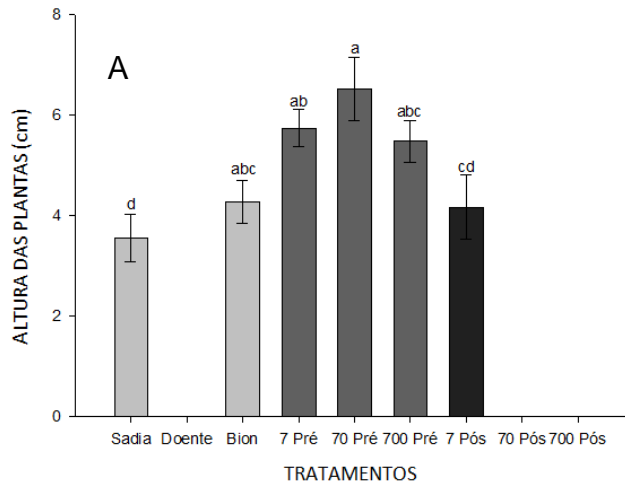
18

1 Figura 2

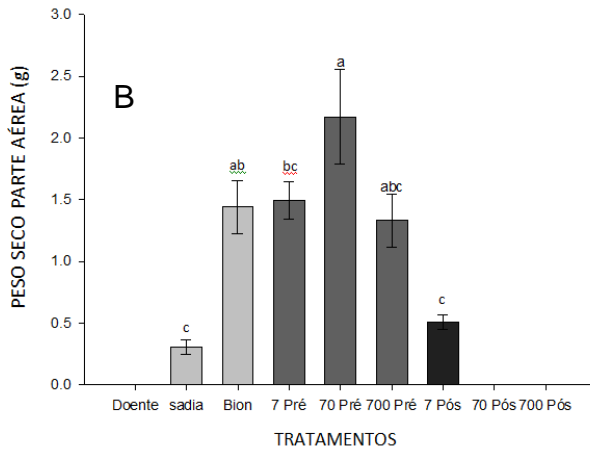


2
3

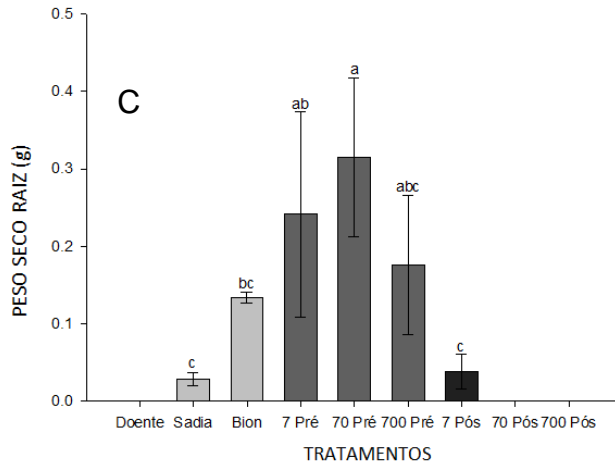
1 Figura 3



2



3



4

5

6

Tukey 0.5%. Tratamentos com a mesma letra expressam resultados significativamente iguais.

7

8

9

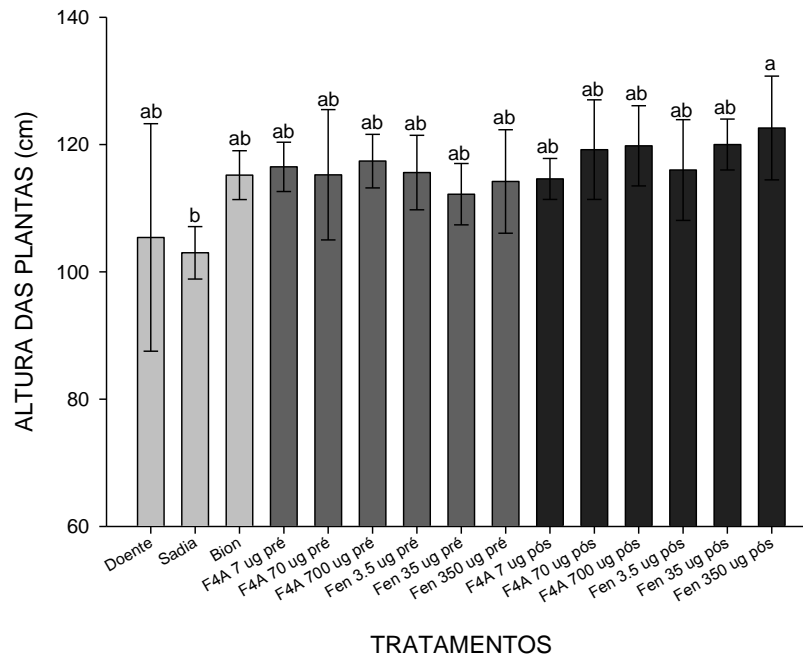
10

11

12

1
2
3

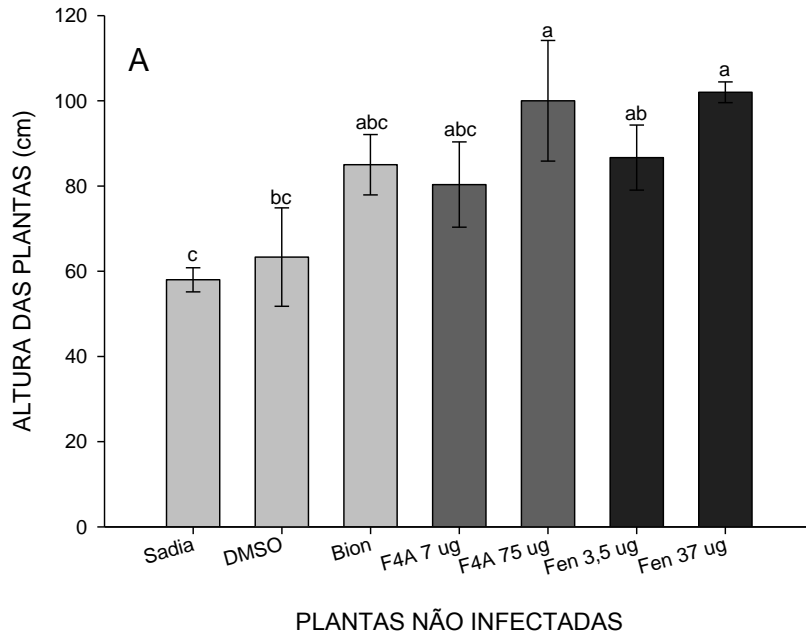
Figura 4



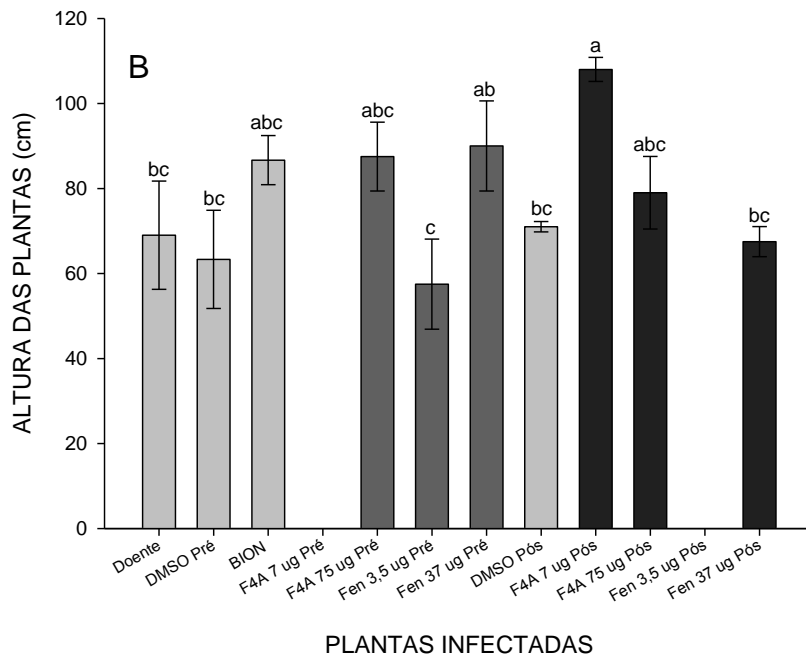
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

Tukey 0.5%. Tratamentos com a mesma letra expressam resultados significativamente iguais.

1
2
3 **Figura 5**



4
5 **PLANTAS NÃO INFECTADAS**

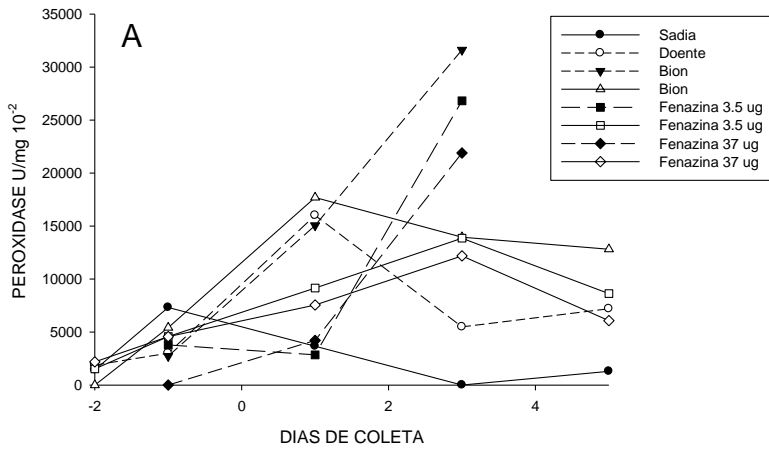


PLANTAS INFECTADAS

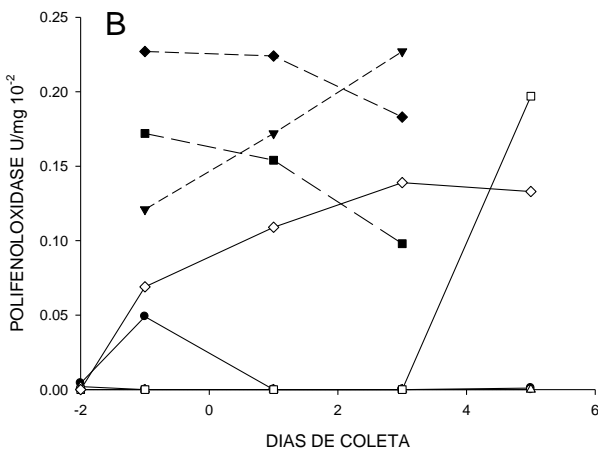
6 Tukey 0.5%. Tratamentos com a mesma letra expressam resultados
7 significativamente iguais.
8

9
10
11
12

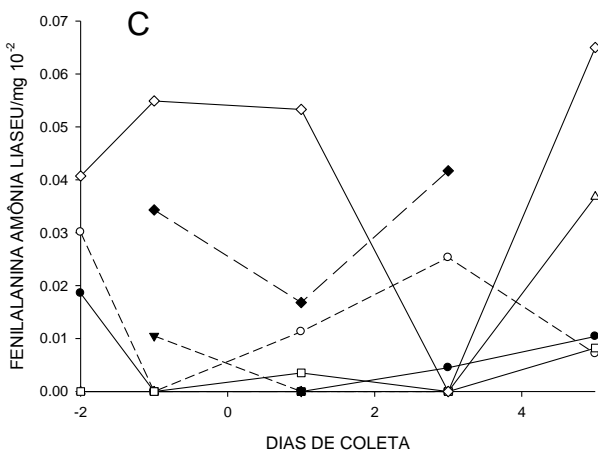
1 Figura 6



2
3

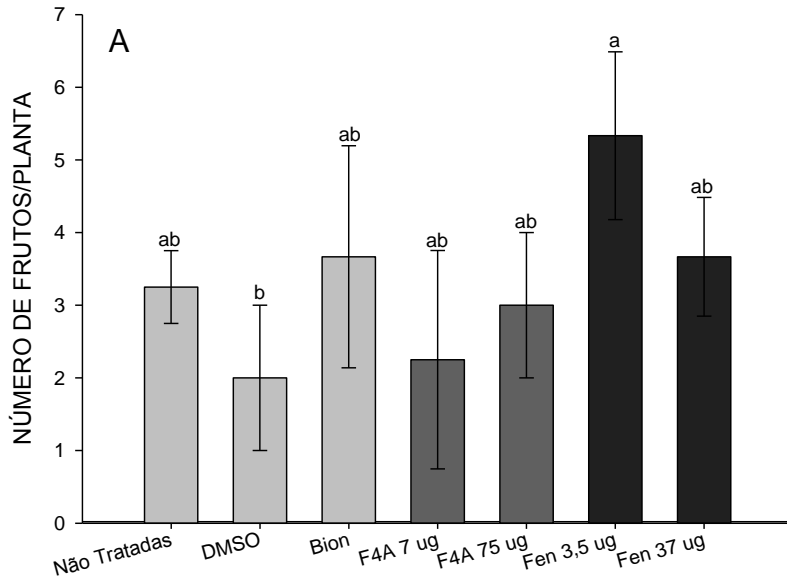


4
5



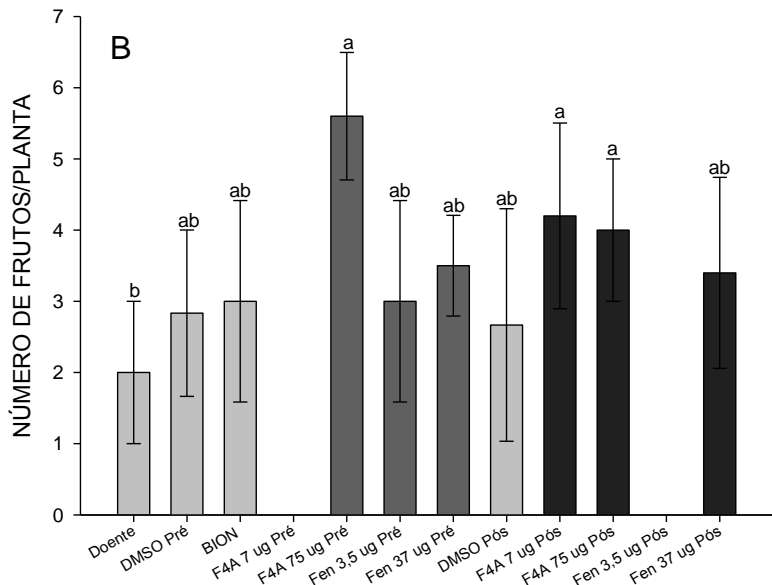
6
7
8
9
10
11

1 Figura 7



2

PLANTAS NÃO INFECTADAS



3

4

5

Tukey 0.5%. Tratamentos com a mesma letra expressam resultados significativamente iguais.

6

7

8

9

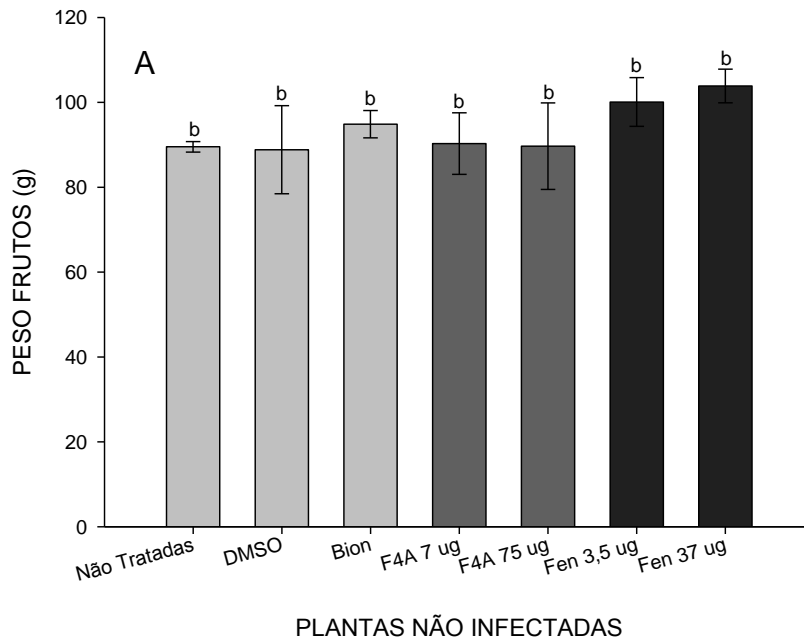
10

11

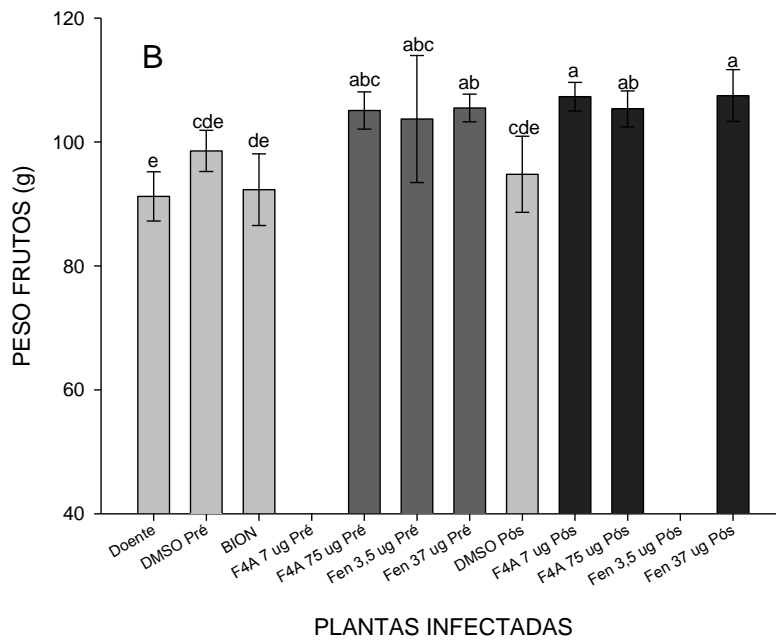
12

PLANTAS INFECTADAS

1
2 **Figura 8**



3



4
5 Tukey 0.5%. Tratamentos com a mesma letra expressam resultados
6 significativamente iguais.
7