



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

David Fernando Posso Suárez

**Mecanismos de Resistência Inata e Induzida por *Saccharomyces cerevisiae*,  
Frações Polissacarídicas de Babosa e Acibenzolar-S-Metil em Plantas de  
Pimentão a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria***

Florianópolis, 2023

David Fernando Posso Suárez

**Mecanismos de Resistência Inata e Induzida por *Saccharomyces cerevisiae*,  
Frações Polissacarídicas de Babosa e Acibenzolar-S-Metil em Plantas de  
Pimentão a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito parcial  
para a obtenção do título de doutor em Ciências  
com Ênfase em Recursos Genéticos Vegetais

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Florianópolis, 2023

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

Posso Suárez, David Fernando  
Mecanismos de Resistência Inata e Induzida por  
Saccharomyces cerevisiae, Frações Polissacarídicas de Babosa  
e Acibenzolar-S-Metil em Plantas de Pimentão a Xanthomonas  
euvesicatoria pv. euvesicatoria / David Fernando Posso  
Suárez ; orientador, Robson Marcelo Di Piero, 2023.  
148 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,  
2023.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Indução de  
Resistência de Plantas. 3. Mecanismos de Defesa. 4. Manejo  
Alternativo. 5. Produtos Naturais. I. Di Piero, Robson  
Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.  
III. Título.

David Fernando Posso Suárez

**Mecanismos de Resistência Inata e Induzida por *Saccharomyces cerevisiae*, Frações Polissacarídicas de Babosa e Acibenzolar-S-Metil em Plantas de Pimentão a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria***

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 28 de abril de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. José Renato Stangarlin  
Instituição: Unioeste

Dr. (a). Alice María Quezado Duval  
Instituição: Embrapa Hortaliças

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Instituição: UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciências com Ênfase em Recursos Genéticos Vegetais.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero  
Orientador

Florianópolis, 2023

***Este trabalho é dedicado a Deus, e às pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Blanca, meu pai Christian Alberto, meu irmão Christian Manuel e minha sobrinha Maria José. Obrigado.***

## **AGRADECIMENTOS**

Depois de agradecer a Deus, a quem sempre peço direção e a minha família, me sinto muito agradecido com o professor Dr. Robson Marcelo Di Piero, que sempre com paciência caminhou comigo desde o início até o fim do doutorado, orientando-me e ajudando-me a melhorar como pessoa e como profissional.

Meus agradecimentos ao professor Marciel Stadnik por permitir-me ser parte da equipe do laboratório de Fitopatologia e por suas aulas.

Agradeço ao técnico do laboratório Dr. Mateus Brusco por sua disponibilidade e por suas boas ideias que contribuíram para a realização de todos os experimentos.

Agradeço ao Dr. Ricardo Felipini por ter contribuído com suas ideias para melhorar minha pesquisa.

A todos meus amigos e colegas do laboratório muito obrigado por todo o compartilhado e por todas as experiências vividas durante estes anos.

A meus amigos Colombianos em Florianópolis e o pessoal de Uga-Buga obrigado por sua companhia e pelos momentos vividos.

Dou graças ao Programa de Recursos Genéticos Vegetais e a todos os professores (as) que influenciaram em acrescentar meus conhecimentos para fazer de mim um melhor profissional.

Meus reconhecimentos a todos os membros da Banca de Defesa de Tese Dr. José Renato Stangarlin, Dra. Alice Quezado Duval e Dr. Valdir Marcos Stefenon por suas contribuições ao enriquecimento de meus conhecimentos e a realização de minha tese.

Impossível não agradecer a todas essas pessoas da comunidade universitária que contribuíram à possível realização desta tese: o pessoal da faxina, da segurança, ao pessoal do RU e da biblioteca.

À CAPES obrigado por ter financiado minha bolsa de doutorado.

Finalmente quero agradecer ao Brasil e a Florianópolis por ter-me recebido com alegria durante todo este tempo.

***Muitas são as lições que podem ser tiradas do estudo das plantas, se o verdadeiro espírito de sabedoria for buscado (JOHN HUTTON BALFOUR).***

## RESUMO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.), pertencente à família Solanáceae, é uma das hortaliças mais cultivadas no Brasil, com uma produção de 224.286 toneladas e estabelecida em aproximadamente 13 mil hectares. Dentre os problemas fitossanitários que afetam essa cultura se encontra a mancha foliar causada pela bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, que compromete a produção, já que afeta a planta em qualquer fase de seu desenvolvimento. O controle desta bacteriose baseia-se principalmente na implementação de cultivares resistentes e no uso de produtos de proteção fitossanitária à base de cobre em combinação com antibióticos, produtos que intensificam a pressão de seleção de bactérias resistentes, acarretando problemas econômicos, ecológicos e à saúde humana. Uma alternativa para controlar essa bacteriose na cultura de pimentão é a indução de resistência, por meio da ativação dos mecanismos de defesa da planta, mediante o uso de produtos de baixo impacto ambiental, como a levedura do fermento *Saccharomyces cerevisiae* ou a babosa (*Aloe barbadensis*). Dessa maneira, os objetivos desta pesquisa foram elucidar os mecanismos de resistência ativados em diferentes cultivares de pimentão para resistir ao ataque da mancha bacteriana causada por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* e avaliar o efeito protetor e o modo de ação de suspensões celulares de *S. cerevisiae* e de frações polissacarídicas da babosa no controle dessa doença. Para elucidar quais mecanismos de resistência são ativados em diferentes cultivares de pimentão, foram utilizadas plantas das cultivares All Big, Yolo Wonder e Amarelo SF. Plantas das diferentes cultivares foram inoculadas com o isolado 112-P de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ) e 14 dias após da inoculação (DAI), a cada 7 dias e por um período de 28 dias foi avaliada visualmente a severidade dos sintomas causados pela bactéria. Em outro grupo de plantas das mesmas cultivares e inoculadas da mesma maneira, foi analisada a atividade de enzimas de defesa guaiacol de peroxidase (POX), catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO), lipoxigenase (LPOX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides, o número de estômatos apresentando reação de hipersensibilidade (RH), o número de células exibindo acúmulo de calose, e os teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides. Inicialmente, foi observado que as plantas da cultivar mais suscetível, All Big, apresentaram maiores atividades das enzimas POX e PFO, maior acúmulo de

calose e maior teor de clorofila *a*. Ao passo, foi observado um aumento na atividade da enzima CAT na cultivar Yolo Wonder e da enzima LPOX na cultivar Amarelo SF, nesta última também se encontrou o maior número de células com reação de hipersensibilidade. Ainda foi observado que as plantas da cultivar All Big apresentaram um teor de clorofila *a* superior ao das plantas Amarelo SF e Yolo Wonder. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no teor de carotenoides nas plantas das diferentes cultivares. Por outro lado, para avaliar o efeito protetor e o modo de ação de suspensões celulares de *Saccharomyces cerevisiae* no controle dessa doença, plantas de pimentão da cultivar Rubi Gigante foram pulverizadas com uma suspensão de *S. cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) e 3 dias após desafiadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (0,6 U.A. a 600 nm). Como controle negativo as plantas foram pulverizadas com água destilada e como controle positivo foram pulverizadas com o indutor Bion® (acibenzolar-S-metil - ASM) a 50 ppm do ingrediente ativo. Foi avaliada a severidade da mancha bacteriana, e a atividade de enzimas de defesa POX, CAT, PFO, FAL, e do teor de clorofila *a*, *b* e carotenóides. Posteriormente, este experimento foi repetido e conduzido da mesma maneira, porém utilizando a cultivar All Big, a qual apresenta maior suscetibilidade que Rubi Gigante. Neste experimento a suspensão de *S. cerevisiae* reduziu a severidade da mancha bacteriana em até 20% e ativou a enzima catalase (CAT) na cultivar Rubi Gigante, enquanto na cultivar All Big a reduziu em até 35%, e ativou as enzimas peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PFO). Já o ASM reduziu a doença em até 40% na cultivar Rubi Gigante e em até 85% na cultivar All Big, e ativou as enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), POX e PFO somente na Rubi Gigante. Finalmente, foi avaliado o efeito de duas frações polissacarídicas de babosa na redução da mancha bacteriana, uma fração de coloração branca (Bab FB) e outra de coloração rosa (Bab FR), ambas obtidas através de precipitação etanólica do gel de folhas de babosa. Primeiramente, plantas de pimentão cv. Rubi Gigante foram pulverizadas com a Bab FB a 0,5, 1,5 e 3 mg/mL, autoclavadas a 120°C por 20 minutos, e aplicada nas plantas 3 dias antes da inoculação (DAi) com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Posteriormente, no intuito de saber qual modo de preparo das frações é mais eficiente para reduzir os sintomas da doença, ambas as frações foram submetidas a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento (30 min a 100°C, 20 min a 120°C ou 30 min a 60°C) e aplicadas 3 dias antes da inoculação. Finalmente foi verificada a influência do intervalo de

aplicação da Bab FB e da Bab FR a 3 mg/mL (aquecidas por 30 minutos a 100°C), aplicadas 3 ou 7 dias antes da inoculação, e comparadas com o indutor ASM a 50 ppm do ingrediente ativo. Primeiramente, foi observado que, a Bab FB a 0.5, 1.5 e 3 mg/mL e aquecida a 120°C por 30 minutos não reduziu a severidade da doença. Contudo, foi observado que a Bab FB e a Bab FR, ambas a 3 mg/mL e aquecidas por 30 minutos a 100°C, reduziram a severidade da doença aos 28 e 21 dias após a inoculação (DAI). No entanto, no seguinte experimento quando a Bab FB e a Bab FR, ambas a 3 mg/mL, foram aquecidas a 100°C por 30 minutos e aplicadas 3 ou 7 dias antes da inoculação não reduziram significativamente a severidade dos sintomas de mancha bacteriana. Pelo contrário, o ASM sempre reduziu significativamente a severidade da doença. Com os resultados do presente estudo se conclui que a atividade de CAT, LPOX e o acúmulo de células com reação de hipersensibilidade estão envolvidos na resistência inata de pimentão a *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Por outro lado, se conclui que a levedura *S. cerevisiae* e o ASM apresentam potencial para auxiliar no manejo da doença.

**Palavras-chave:** Mancha foliar, controle alternativo, mecanismos de defesa, indução de resistência, estresse oxidativo, pigmentos fotossintéticos, cultivares.

## ABSTRACT

Bell pepper (*Capsicum annuum* L.), belonging to the Solanaceae family, is one of the most cultivated vegetables in Brazil, with a production of 224,286 tons and established in approximately 13 thousand hectares. The leaf spot caused by the bacterium *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* is among the phytosanitary problems that affect this crop, which compromises production, as it affects the plant at any stage of its development. The control of this bacteriosis is based mainly on the implementation of resistant cultivars and the use of plant protection products based on copper in combination with antibiotics that intensify the selection pressure of resistant bacteria, causing economic, ecological and human health problems. An alternative to control this bacteriosis in the sweet pepper culture is the induction of resistance, through the activation of the plant's defense mechanisms, through the use of products with low environmental impact, such as yeast *Saccharomyces cerevisiae* or aloe vera (*Aloe barbadensis*). Thus, the objectives of this research are to elucidate the resistance mechanisms activated in different pepper cultivars to resist the attack of bacterial leaf spot caused by *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* and evaluate the protective effect and mode of action of cell suspensions of *S. cerevisiae* and aloe polysaccharide fractions in controlling this disease. To elucidate which resistance mechanisms are activated in different bell pepper cultivars, plants of the All Big, Yolo Wonder and Amarelo SF cultivars were used. Plants of different cultivars were inoculated with the 112-P isolate of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (A600 nm = 0.6) and 14 days after inoculation (DAI), every 7 days and for a period of 28 days, the severity of the symptoms caused by the bacteria was visually evaluated. In another group of plants of the same cultivars and inoculated in the same way, the activity of defense enzymes guaiacol peroxidase (POX), catalase (CAT), polyphenoloxidase (PFO), lipoxygenase (LPOX) and phenylalanine ammonia lyase (FAL), the content of phenolic and flavonoid compounds, the number of stomata showing a hypersensitivity reaction (HR), the number of cells showing callose accumulation, and the levels of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids. Plants of the most susceptible cultivar, All Big, had higher POX and PFO enzyme activities, higher callose accumulation and higher contents of chlorophyll *a*. At the same time, an increase in the activity of the CAT enzyme in the Yolo Wonder cultivar and of the LPOX enzyme in the Amarelo SF cultivar was observed, in the latter

the highest number of cells with hypersensitivity reaction was also found. It was also observed that the All Big cultivar plants had a higher chlorophyll than the Amarelo SF and Yolo Wonder plants. However, no significant differences were observed in carotenoid content in plants of different cultivars. On the other hand, to evaluate the protective effect and mode of action of cell suspensions of *Saccharomyces cerevisiae* in controlling this disease, sweet pepper plants of the Rubi Gigante cultivar were sprayed with a suspension of *S. cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>) 3 days after being challenged with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (0.6 AU at 600 nm). As a negative control, the plants were sprayed with distilled water and as a positive control, they were sprayed with the inducer Bion® (acibenzolar-S-methyl - ASM) at 50 ppm of the active ingredient. The severity of the bacterial spot was evaluated, as well as the activity of defense enzymes POX, CAT, PFO, FAL, and the content of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids. Subsequently, this experiment was repeated and conducted in the same way, but using the All Big cultivar, which is more susceptible than Rubi Gigante. In this experiment, the suspension of *S. cerevisiae* reduced the severity of the bacterial spot by up to 20% and activated the catalase enzyme (CAT) in the Rubi Gigante cultivar, while in the All Big cultivar it reduced it by up to 35%, and activated the peroxidase enzymes (POX) and polyphenol oxidase (PFO). ASM, on the other hand, reduced the disease by up to 40% in the Rubi Gigante cultivar and by up to 85% in the All Big cultivar, and activated the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (FAL), POX and PFO only in Rubi Gigante. Finally, the effect of two aloe vera polysaccharide fractions on the reduction of bacterial spot was evaluated, a white fraction (Bab FB) and a pink one (Bab FR), both obtained through ethanolic precipitation of aloe leaf gel. Firstly, sweet pepper plants cv. Rubi Gigante were sprayed with Bab FB at 0.5, 1.5 and 3 mg/mL, autoclaved at 120°C for 20 minutes, and applied to the plants 3 days before inoculation (DAi) with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Subsequently, in order to find out which way of preparing the fractions is more efficient to reduce the symptoms of the disease, both fractions were submitted to different temperatures and heating times (30 min at 100°C, 20 min at 120°C or 30 min at 60°C) and applied 3 days before inoculation. Finally, the influence of the application interval of Bab FB and Bab FR at 3 mg/mL (heated for 30 minutes at 100°C), applied 3 or 7 days before inoculation, and compared with the ASM inducer at 50 ppm was verified. First, it was observed that Bab FB at 0.5, 1.5 and 3 mg/mL and heated at 120°C for 30 minutes did not reduce disease

severity. After, Bab FB and Bab FR, both at 3 mg/mL and heated for 30 minutes at 100°C, reduced disease severity at 28 and 21 days after inoculation (DAI). However, in the following experiment when Bab FB and Bab FR, both at 3 mg/mL, were heated to 100°C for 30 minutes and applied 3 or 7 days before inoculation, they did not significantly reduce the severity of bacterial spot symptoms. On the contrary, ASM has always significantly reduced disease severity. With the results of the present study it is concluded that the activity of CAT, LPOX and the accumulation of cells with hypersensitivity reaction are involved in the innate resistance of pepper to *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. On the other hand, it is concluded that the yeast *S. cerevisiae* and ASM have the potential to help manage the disease.

**Keywords:** Leaf spot, alternative control, defense mechanisms, resistance induction, oxidative stress, photosynthetic pigments, cultivars.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder, aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI) com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). Médias seguidas pela mesma letra, dentro do mesmo tempo de avaliação, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os dados aos 28 DAI foram transformados mediante a raiz quadrada. .... 74

**Figura 2.** Atividade de peroxidase (POX) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. .... 75

**Figura 3.** Atividade de polifenoloxidase (PFO) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. .... 75

**Figura 4.** Atividade de catalase (CAT) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. Os dados aos 28 DAI foram transformados mediante a raiz quadrada. 76

**Figura 5.** Atividade de lipoxigenase (LPOX) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. .... 77

**Figura 6.** Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). NS: não significativo pelo teste de Tukey a 5%. .. 78

**Figura 7.** Teor de compostos fenólicos em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). NS: não significativo pelo teste de Tukey a 5%. .... 78

**Figura 8.** Teor de flavonóides em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). NS: não significativo pelo teste de Tukey a 5%. .... 79

**Figura 9.** Número de células com reação de hipersensibilidade (RH) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada 24 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. .... 80

**Figura 10.** Número de células com acúmulo de calose em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada 24 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. .... 80

**Figura 11.** Conteúdo de clorofila *a* em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24 e 96 horas após a inoculação. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. .... 81

**Figura 12.** Conteúdo de clorofila *b* em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24 e 96 horas após a inoculação. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. .... 82

**Figura 13.** Conteúdo de carotenoides em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24 e 96 horas após a inoculação. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. .... 82

**Figura 14.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão cv. Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 106

**Figura 15.** Severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. .... 107

**Figura 16.** Severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. (Dados dos 14 e 21 DAI foram transformados mediante raiz quadrada).

**Figura 17.** Atividade de peroxidase (POX) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 109

**Figura 18.** Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 109

**Figura 19.** Atividade de catalase (CAT) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 110

**Figura 20.** Atividade de polifenoloxidase (PFO) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 110

**Figura 21.** Atividade de peroxidase (POX) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 111

**Figura 22.** Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 112

**Figura 23.** Atividade de catalase (CAT) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com

diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 112

**Figura 24.** Atividade de polifenoloxidase (PFO) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. (Dados dos 24 HAI foram transformados mediante raiz quadrada). .... 113

**Figura 25.** Conteúdo de clorofila *a* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%. 114

**Figura 26.** Conteúdo de clorofila *b* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 114

**Figura 27.** Conteúdo de carotenoides em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%. 115

**Figura 28.** Conteúdo de clorofila *a* em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%. .... 116

**Figura 29.** Conteúdo de clorofila *b* em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. .... 116

**Figura 30.** Conteúdo de carotenoides em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X.*

*euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%. **117**

**Figura 31.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada ou fração branca de babosa (Bab FB) a 0.5, 1.5 e 3 mg/mL aquecidas a 120°C por 20 minutos, 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%. **139**

**Figura 32.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, fração branca (Bab FB) e fração rosa da babosa (Bab FR) a 3mg/mL, submetidas a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento (20 min a 120°C, 30 min a 100°C, ou 30 min a 60°C), 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. Os dados deste experimento foram transformados mediante a raiz quadrada. .... **140**

**Figura 33.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm, ou fração branca (Bab FB), e fração rosa da babosa (Bab FR) a 3mg/mL (aquecidas 30 minutos a 100°C) 3 e 7 dias antes da inoculação (DAI) com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Os dados deste experimento foram transformados mediante a raiz quadrada..... **141**

**Figura 34.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm, ou fração branca (Bab FB), e fração rosa da babosa (Bab FR) a 3mg/mL (aquecidas 30 minutos a 100°C) 3 e 7 dias antes da inoculação (DAI) com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (DAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Os dados deste experimento foram transformados mediante o logaritmo de (n+1)... **141**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- a.C** – Antes de Cristo
- AJ** – Ácido jasmônico
- AS** - Ácido salicílico
- ASM** - acibenzolar-S-metil
- AVr** - Proteínas de virulência microbiana
- Bab FB** - Fração branca da babosa
- Bab FR** - Fração rosa da babosa
- BDA** – Batata dextrose ágar
- BTH** - Ácido benzo 1,2,3 tiadiazol-7-carbotioico-S-metil éster
- °C** – graus centígrados
- CAT** – Catalase
- cm** - Centímetros
- CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono
- cv** – Cultivar
- DAB** - 3,3 - diaminobenzidiazol
- DAi** - Dias antes da inoculação
- DAp** - Dias após a inoculação
- DF** - Distrito Federal
- EAG** - equivalentes de ácido gálico
- EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético
- EF-Tu** - Fator de alongação Tu
- EQ** - Equivalentes de quercetina
- ET** - Etileno
- ETI** – *Effector triggered immunity*
- FAL** - Fenilalanina amônia-liase
- g** – Gramas
- g** – Força *g*
- h** - Horas
- HAI** - Horas após a inoculação
- HCl**: ácido clorídrico
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**IAA** - Ácido indol-3-acético  
**IBGE**: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
**IR**: indutores de resistência  
**kDa**: quilodaltons  
**L** – Litros  
**LPC**: Lei de Proteção de Cultivares  
**LPS** - Lipopolisacarídeos  
**LPOX** – Lipoxigenase  
**MAMPs** – *Microbe associated molecular pattern*  
**MAPA**: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
**mg** – Miligramas  
**MF** – Massa fresca  
**mm** - Milímetros  
**mM** – Milimolar  
**min** – Minutos  
**mL** – Mililitros  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – Carbonato de sódio  
**N-P-K** – Nitrogênio – fósforo – potássio  
**Ns** – Não significativo  
**nm** - Nanômetros  
**OH<sup>-</sup>** - Radical hidroxila  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Radical superóxido  
**O<sub>2</sub>** – Oxigênio  
**PAMPs** – *Pathogen associated molecular pattern*  
**PFO** – Polifenoloxidase  
**ppm** – Partes por milhão  
**POX** – Peroxidase  
**PRP's** - Proteínas relacionadas à patogênese  
**PRRs** - *Pattern recognition receptors*  
**PTI** - *PAMP-triggered immunity*  
**pv**: patovar  
**R** – Proteínas de resistência  
**RH**- Reação de hipersensibilidade

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**SAR** - Resistência sistêmica adquirida

**SNPC:** Serviço Nacional de Proteção de Cultivares

**spp.:** espécies

**TSWV** - *Tomato spotted wilt virus*

**T3SS** – Sistema de secreção tipo III

**UFC** – Unidades Formadoras de Colônias

**U** - Unidades

**μL** – Microlitros

**μm** – Micrómetros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>28</b>
2.1.1	Objetivos específicos	28
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I - Patossistema pimentão x <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> e indução de resistência</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>A cultura do pimentão (<i>Capsicum annuum</i>)</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Xanthomonas</i> causadoras de manchas bacterianas em solanáceas</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Mancha bacteriana do pimentão - <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i></b>	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>Indução de resistência em plantas</b>	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Mecanismos de defesa em plantas</b>	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Indutores de resistência</b>	<b>40</b>
3.6.1	Acibenzolar-S-metil	40
3.6.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.6.3	Babosa ( <i>Aloe barbadensis</i> Miller)	43
	<b>Referências</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II: Mecanismos de resistência contra <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em cultivares de pimentão</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Introdução</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>67</b>
4.2.1	Semeadura do pimentão	67
4.2.2	Preparo e calibração do inóculo bacteriano	67
4.2.3	Severidade de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em diferentes cultivares de pimentão	67
4.2.4	Atividade de enzimas antioxidantes e de defesa	68
4.2.5	Reação de hipersensibilidade	71
4.2.6	Acúmulo de calose	72
4.2.7	Teor de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides de plantas de pimentão All Big, Yolo Wonder, Amarelo SF e inoculadas com <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i>	72
4.2.8	Delineamento experimental e análise de dados	73
<b>4.3</b>	<b>Resultados</b>	<b>73</b>
4.3.1	Análise da severidade de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em diferentes cultivares de pimentão	73
4.3.2	Atividade de enzimas antioxidantes e de defesa	74
4.3.3	Análises de componentes da via dos fenilpropanóides	77
4.3.4	Análises microscópicas	79

4.3.5 Pigmentos fotossintéticos .....	81
<b>4.4 Discussão.....</b>	<b>83</b>
<b>4.5 Conclusões .....</b>	<b>87</b>
<b>Referências .....</b>	<b>88</b>
<b>5 CAPÍTULO III: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e acibenzolar-S-metil (ASM): indução de resistência em pimentão a <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i></b>	<b>94</b>
<b>5.1 Introdução .....</b>	<b>98</b>
<b>5.2 Material e métodos.....</b>	<b>100</b>
5.2.1 Semeadura do pimentão.....	100
5.2.2 Preparo da suspensão celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	101
5.2.3 Preparo e calibração do inóculo bacteriano .....	101
5.2.4 Efeito da aplicação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre a severidade de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em plantas de pimentão.....	101
5.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes e de defesa.....	102
5.2.6 Atividade de peroxidase de guaiacol – POX .....	102
5.2.7 Atividade de catalase CAT .....	103
5.2.8 Atividade de polifenoloxidase – PFO .....	103
5.2.9 Atividade fenilalanina amônia-liase – FAL .....	103
5.2.10 Proteínas totais .....	104
5.2.11 Teor de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides de plantas de pimentão tratadas com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e ASM e inoculadas com <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> .....	104
5.2.12 Delineamento experimental e análise de dados.....	105
<b>5.3 Resultados .....</b>	<b>105</b>
5.3.1 Efeito da aplicação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e ASM sobre a severidade de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em plantas de pimentão cv. Rubi Gigante e cv. All Big.....	105
5.3.2 Atividade enzimática.....	108
5.3.3 Teor de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides.....	113
<b>5.4 Discussão.....</b>	<b>117</b>
<b>5.5 Conclusões .....</b>	<b>121</b>
<b>Referências .....</b>	<b>122</b>
<b>6 CAPÍTULO IV: Efeito da babosa (<i>Aloe barbadensis</i>) no controle da mancha foliar de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em pimentão .....</b>	<b>131</b>
<b>6.1 Introdução .....</b>	<b>135</b>
<b>6.2 Material e métodos.....</b>	<b>136</b>
6.2.1 Semeadura do pimentão.....	136
6.2.2 Extração de frações polissacarídicas da babosa e preparo das suspensões.....	137

6.2.3 Preparo e calibração do inóculo bacteriano .....	137
6.2.4 Efeito da aplicação das frações polissacarídicas de babosa e ASM sobre a severidade de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em plantas de pimentão cv. Rubi Gigante.....	138
6.2.5 Delineamento experimental e análise de dados .....	138
<b>6.3 Resultados .....</b>	<b>139</b>
6.3.1 Efeito da aplicação de Bab FB, Bab FR e ASM sobre a severidade de <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> em plantas de pimentão.....	139
<b>6.4 Discussão.....</b>	<b>142</b>
<b>6.5 Conclusões .....</b>	<b>144</b>
<b>Referências .....</b>	<b>145</b>
<b>7 Conclusão geral e perspectivas .....</b>	<b>148</b>

## 1 Introdução

O gênero *Capsicum* compreende um grupo diverso de pimentas e pimentões originários da América Central e do Sul. Estima-se que este gênero esteja composto por 27 espécies, e que sua distribuição geográfica para outros continentes aconteceu no século XVI através de comerciantes espanhóis e portugueses (GURNANI ET AL., 2016; IBIZA et al., 2012).

No mundo, o pimentão é a hortaliça mais importante depois do tomate. Estima-se que um quarto da população mundial a utiliza na culinária, devido a suas características e princípios ativos que lhe conferem aroma e sabor e por sua diversificada coloração atribuída à presença de carotenos e de carotenoides, como a capsantina e a capsorubina, que são pigmentos benéficos para a saúde humana, devido a que apresentam vitamina A e propriedades antioxidantes e anticancerígenas (BEKELE, 2022; SMITH, 2015; MOREIRA et al., 2006; BIANCHI e PENTEADO, 1998; DAVIES, SUSAN e KIRK, 1970).

Já o Brasil é referenciado como um centro secundário de diversidade de espécies domesticadas do gênero *Capsicum* (CARVALHO et al., 2003; REIFSCHNEIDER, 2000), onde o Rio de Janeiro é o centro de diversidade composto com o maior número de táxons silvestres deste gênero (SUDRÉ et al., 2005). Atualmente, no território brasileiro, a cultura de pimentão se encontra estabelecida em aproximadamente 13 mil hectares, com uma produção de 224.286 toneladas de frutos por ano, onde São Paulo é o maior produtor com 60.176 toneladas (IBGE, 2022).

A cultura do pimentão é afetada pela ocorrência de diferentes enfermidades, entre elas as bacterioses, que causam desfolhamentos, necroses foliares, diminuição da qualidade dos frutos e da produção (AGUIAR et al., 2003). No entanto, a principal bacteriose que acomete a cultura do pimentão é a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, a qual causa danos foliares em qualquer fase da cultura, afetando negativamente a produção (OBRADOVIC et al. 2004; JONES et al., 2004; SILVA et al., 2006; COSTA et al., 2002).

O controle da mancha bacteriana do pimentão é realizado principalmente utilizando cultivares resistentes, contudo, estes não apresentam sucesso sem o uso de medidas adicionais como o controle químico (POTNIS, 2019). Para conservar a eficácia dos principais genes de resistência à mancha bacteriana, é recomendado

realizar controle com produtos à base de cobre em combinação com antibióticos agrícolas (ROWELL et al., 2001). Porém, os princípios ativos destes produtos podem intensificar a pressão de seleção de populações bacterianas resistentes, já que a resistência a estes compostos é regulada por genes localizados em seus plasmídeos, os quais podem transferir-se e predominar na seguinte população bacteriana (MARINGONI e KIMATI, 1987; OSDAGHI et al., 2016).

Por exemplo, sensibilidade reduzida ao cobre em *Xanthomonas* foi relatada por Voloudakis, Reignier e Cooksey (2005). No Brasil foram registradas ocorrências de *Xanthomonas* resistentes ao cobre por Maringoni e Kimati (1987); Aguiar et al. (2000), e Strayer-Scherer et al. (2018). Por tais circunstâncias, para diminuir a severidade dessa doença, métodos alternativos de controle poderiam ser utilizados, como a indução de resistência, que consiste na ativação de mecanismos de defesa da planta.

Na planta, os mecanismos de defesa são naturalmente ativados quando receptores de transmembrana das células vegetais PRRs (*Pattern recognition receptors*) reconhecem padrões moleculares associados a patógenos PAMPs (*Pathogen - associated molecular pattern*), de microrganismos MAMPs (*Microbe - associated molecular pattern*) (FERRUSQUIA et al., 2021), ou analogamente podem ser ativados de maneira artificial por meio de indutores de resistência (IR). Os IR são produtos ou compostos que apresentam em sua composição moléculas eliciadoras, as quais ao serem reconhecidas pelos PRRs, ativam de forma sistêmica mecanismos de defesa como a síntese de caloses, lignina, espécies reativas de oxigênio, enzimas antioxidantes, fitoalexinas, liberação de etileno, acúmulo de cálcio e proteínas relacionadas à patogênese (SEGONZAC e ZIPFEL, 2011; CAVALCANTI, BRUNELLI e STANGARLIN, 2005). Certamente, as moléculas eliciadoras podem ser de procedência abiótica como, por exemplo ácido salicílico, ou de origem biótica como polissacarídeos provenientes de cogumelos, crustáceos, plantas ou leveduras (GUZZO; HARAKAVA e TSAI, 2009; FONTENELLE et al., 2011; HAHN, 1999; ANGELOVA; GEORGIEV e ROSS, 2006).

Um dos produtos capazes de ativar os mecanismos de defesa das plantas e que não apresenta ação direta contra patógenos é o acibenzolar-S-Metil (ASM), um análogo do ácido salicílico, que é comercializado no Brasil com o nome de Bion® (SYNGENTA, 2021). Segundo o Agrofit (2022), este produto é recomendado para controlar a clorose variegada (*Xylella fastidiosa*) dos citros, a pinta bacteriana

(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) e a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) do tomate, a mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodão, bacterioses (*Xanthomonas axonopodis* e *Pseudomonas cichori*) em eucalipto, crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) em feijão e mancha aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) em melão.

Analogamente, a levedura do fermento do pão *Saccharomyces cerevisiae* devido a sua capacidade de sintetizar compostos antibióticos, e pela habilidade de competir contra patógenos por espaço e nutrientes no filoplano de diferentes plantas, apresenta potencial para reduzir a severidade de doenças. Suspensões desta levedura reduziram os sintomas de *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* em sorgo, *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão e *Colletotrichum lagenarium* em pepino. Adicionalmente, componentes essenciais desta levedura como a glucana, o ergosterol e/ou quitina atuam como eliciadores que ativam os mecanismos de defesa da planta (PICCININ; DI PIERO e PASCHOLATI, 2005; ZANARDO, PASCHOLATI e FIALHO, 2009).

Por outro lado, existem evidências que o gel de babosa (*Aloe barbadensis* M.) apresenta potencial no controle de doenças de plantas, devido a sua composição rica em fenóis, ácidos orgânicos e inorgânicos, e polissacarídeos como a acemanana, que exibem atividade antimicrobiana (FEMENIA et al., 1999; LUIZ et al., 2017). Tem sido reportado que polissacarídeos de babosa reduzem a severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) em morangueiro (LUIZ et al., 2017) e diminuem a severidade de manchas foliares (*Xanthomonas gardneri*) em tomateiros (LUIZ; DA ROCHA NETO e DI PIERO, 2015).

Produtos de fácil aquisição como a levedura *S. cerevisiae* e a babosa, atuando de modo distinto ao dos produtos de proteção fitossanitária convencionais para o controle de bacterioses, se constituem em uma alternativa que poderia ser associada com a implementação de cultivares resistentes e uso racional de formulações cúpricas e de antibióticos agrícolas, para controlar eficientemente a mancha bacteriana do pimentão causada por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Determinar os mecanismos envolvidos na resistência do pimentão à mancha bacteriana em diferentes cultivares, e avaliar o efeito protetor e o modo de ação de suspensões celulares de *S. cerevisiae* e de frações polissacarídicas de babosa no controle da mancha bacteriana do pimentão causada por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Analisar a indução de enzimas relacionadas à defesa de plantas fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidase (POX), catalase (CAT), e polifenoxidase (PFO), número de estômatos com reação de hipersensibilidade (HR) e com acúmulo de calose, e o teor de pigmentos fotossintéticos em diferentes cultivares de pimentão inoculados com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.
- *In vivo*, analisar a influência de aplicação de suspensões da levedura *S. cerevisiae* na redução da severidade da mancha bacteriana do pimentão.
- Avaliar a indução das enzimas de defesa FAL, POX, CAT e PFO, e o teor de pigmentos fotossintéticos em plantas de pimentão pulverizadas com suspensões celulares de *S. cerevisiae* e inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.
- Verificar a influência de diferentes concentrações, preparos e intervalos de aplicação de frações polissacarídicas de babosa sobre o controle da mancha bacteriana do pimentão.

### 3 CAPÍTULO I - Patossistema pimentão x *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* e indução de resistência

#### 3.1 A cultura do pimentão (*Capsicum annuum*)

O gênero *Capsicum* compreende um grupo diverso de pimentas e pimentões originários da região tropical do continente americano. As pimentas picantes estão disseminadas pelos trópicos de América, África e Ásia onde seus frutos são usados para dar sabor em sua dieta, ao passo que, os pimentões não picantes ou “doces” são preferidos por consumidores de regiões temperadas da Europa e da América do Norte (PICKERSGILL, 1997).

No mundo estima-se que o pimentão é a hortaliça mais importante depois do tomate, e que um quarto da população o utiliza na culinária para a produção de condimentos, temperos e conservas, devido a sua diversificada coloração e por suas características e princípios ativos que lhes conferem aroma e sabor (BEKELE, 2022; SMITH, 2015; MOREIRA et al., 2006; BIANCHI e PENTEADO, 1998; DAVIES, SUSAN e KIRK, 1970; BARBIERILL et al., 2010), e minoritariamente como plantas ornamentais devido a seu valor estético como folhagem variegada, pequeno porte e frutos de coloração intensa (NEITZKE et al., 2010).

As espécies domesticadas do gênero *Capsicum* são *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* e *C. annuum* (PICKERSGILL, 1997; SUDRÉ et al., 2005), das quais o México é referenciado como principal centro de diversidade genética, em particular da espécie *C. annuum* (GARCIA, 2002; SUDRÉ et al; 2005). Já o Brasil é referenciado como um centro secundário de diversidade de espécies domesticadas deste gênero, existindo considerável diversidade nas espécies *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, e são a Bacia Amazônica e o Rio de Janeiro os centros de diversidade com o maior número de táxons silvestres do gênero *Capsicum* (CARVALHO et al., 2003; REIFSCHNEIDER, 2000; SUDRÉ et al., (2005).

No território brasileiro, a Embrapa Clima Temperado (Monte Bonito – Pelotas, RS) é a entidade que tem realizado a coleta, caracterização e conservação de germoplasma de *Capsicum*, ao passo que a Embrapa Hortaliças (Brasília – DF) vem realizando o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças e com

características agronômicas superiores às existentes no mercado (BARBIERILL, 2010). Contudo é o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SNPC/MAPA) regido pela Lei nº 9.456 de Proteção de Cultivares (LPC), a entidade encarregada de outorgar a propriedade intelectual a melhoristas de cultivares, mediante prévia caracterização morfológica e molecular que comprove novidade, homogeneidade e estabilidade de plantas e frutos (SOARES, 2020).

No Brasil, a área cultivada com pimentão corresponde aproximadamente a 13 mil hectares, que representam uma produção próxima a 225.000 mil toneladas de frutos por ano, e é São Paulo o principal estado produtor com mais de 60 mil toneladas (IBGE, 2022). No país são cultivadas as pimentas doces para páprica, as pimentas picantes e principalmente o pimentão, que se caracteriza por ser uma das hortaliças de maior importância econômica no país (OLIVEIRA et al., 2015).

A cultura de pimentão no Brasil é estabelecida com diferentes cultivares, que se diferenciam entre si pelo formato dos frutos retangular, cônico ou quadrados e por sua diversificada coloração marfim, púrpura, creme, laranja, amarela, verde ou vermelho (DA SILVA et al., 2019; RUFINO e PENTEADO, 2006; AGUIAR et al., 2003; FILGUEIRA, 2003). A diversificada coloração de pimentões é atribuída à capacidade de os frutos sintetizar diferentes clorofilas e carotenoides, que são benéficos à saúde humana, devido a que apresentam vitamina A, propriedades antioxidantes e anticancerígenas. Os pimentões verdes e amarelos devem sua coloração à presença de carotenos e de carotenoides oxigenados como as criptoxantinas, ao passo que os pimentões vermelhos têm sua coloração atribuída à presença de carotenoides polioxigenados como as capsantinas e capsorubina (BEKELE, 2022; SMITH, 2015; BIANCHI e PENTEADO 1998).

Para garantir uma boa produção na cultura de pimentão, esta deve ser estabelecida sob condições adequadas de solo, luminosidade, temperatura e umidade (FONTES, DIAS e SILVA, 2005; RYLSKI et al., 1994). Além disso, a cultura do pimentão é exigente nas características químicas e físicas do solo, e responde bem a adubos orgânicos, minerais e corretivos, práticas que em média representam 23% do custo da produção (RIBEIRO et al., 2000).

Na maior parte dos casos, o cultivo de pimentão no Brasil é estabelecido em campo aberto com o uso da irrigação por sulco, cuja produtividade atinge entre 25 e

50 toneladas por hectare. Contudo, o sistema de cultivo em ambiente protegido tem sido empregado em várias regiões como uma alternativa mais viável em termos econômicos quando se compara com o sistema de produção tradicional, devido a que neste sistema se atingem produções de até 150 toneladas por hectare, próximo ao dobro do que é obtido ao ar livre, além de ser possível a produção em diferentes épocas do ano (OLIVEIRA et al., 2015; MAROUELLI e SILVA; 2012; LÚCIO et al., 2004). Também o sistema orgânico em campo aberto ou estufa apresenta preços diferenciados, no entanto a competitividade desses produtos depende de incorporação de tecnologias ou de outras alternativas que assegurem a sustentabilidade (MOREIRA et al., 2010).

### **3.2 *Xanthomonas* causadoras de manchas bacterianas em solanáceas**

A cultura do pimentão é afetada pela ocorrência de diferentes enfermidades, entre elas bacterioses que causam murchas, desfolhamentos ou necroses foliares, que afetam negativamente a qualidade dos frutos e da produção (AGUIAR et al., 2003). Entre os patógenos que acometem a cultura do pimentão destacam-se as bactérias do gênero *Xanthomonas*. Estas bactérias infectam em diferentes nichos ecológicos mais de 400 hospedeiros de 11 e 57 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas, respectivamente (BARAK et al., 2016).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são bactérias gram-negativas, aeróbicas, possuem um único flagelo para sua locomoção e apresentam formato de bastonetes retos, cujas dimensões oscilam entre 0,4-0,7 x 0,7-1,8 µm. *In vitro*, a maioria das espécies de *Xanthomonas* se caracterizam por formar colônias brilhantes, viscosas, de bordos lisos e com coloração amarela intensa atribuída à presença de um pigmento denominado de xanthomonadina. Contudo, algumas bactérias deste gênero, devido à ausência deste pigmento, formam colônias brancas (AMORIN; REZENDE e BERGAMIN et al., 2011).

Segundo Kyeon (2016), as primeiras evidências de bactérias causadoras de manchas foliares foram reportadas na cultura de tomate por Doidge (1921) na África do Sul como *Bacterium vesicatoria* e por Gardner e Kendrick (1921) em Indiana, EUA como *Bacterium exitiosum*. Inicialmente, ambas bactérias foram classificadas como *X. vesicatoria* e posteriormente como *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Já Vauterin et al. (1990) e Stall et al. (1994) identificaram dentro de *X. campestris* pv. *vesicatoria* dois grupos geneticamente e fenotipicamente distintos que foram classificados como grupo A e grupo B. Os isolados do grupo A foram caracterizados por não hidrolisar amido e pectina e os isolados do grupo B foram caracterizados por hidrolisar fortemente estes compostos. Após a identificação destes dois grupos, Vauterin et al. (1995), mediante análise de DNA, confirmaram que os isolados dos grupos A e B não estavam relacionados ao nível de espécie, de maneira que os isolados do grupo B foram mantidos em *X. vesicatoria* e os isolados do grupo A como patovar de *X. axonopodis*.

Todas as *Xanthomonas* causadoras da doença denominada mancha bacteriana em solanáceas foram reclassificadas por Jones et al. (2004) em quatro espécies: *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* e *X. euvesicatoria*. Atualmente, a mancha bacteriana do tomate e do pimentão são causadas por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (anteriormente *X. euvesicatoria*), *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (anteriormente *X. perforans*), *X. hortorum* pv. *gardneri* (anteriormente *X. gardneri*) e *X. vesicatoria* (KIZHEVA et al., 2023).

Em pimentão e em tomate causam doença *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Já *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e *X. hortorum* pv. *gardneri* infectam apenas o tomate. Por outra parte, *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* tem forte atividade amilolítica e pectolítica, mas *X. hortorum* pv. *gardneri* e *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* não (JONES et al., 2004; STALL et al., 1994).

Especificamente, a espécie *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* apresenta uma única proteína de 32 kDa, a qual não tem atividade amilolítica nem pectolítica. Pelo contrário, as outras espécies de *Xanthomonas* causadoras de manchas foliares possuem uma única proteína de 27 kDa, a qual apresenta atividade amilolítica e pectolítica (JONES et al., 2004). Além disso, existem diferenças quanto à utilização de fontes de carbono entre estas espécies (KYEON et al., 2016).

Areas et al. (2015) afirmam que o principal agente causador da mancha bacteriana do pimentão no país é *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, a qual causa perdas consideráveis nessa cultura (MORETTI et al., 2009). Com relação ao Brasil, todas as espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana de tomate e *Capsicum* spp. estão presentes (QUEZADO-DUVAL et al., 2004; WORTHINGTON et al., 2012).

### 3.3 Mancha bacteriana do pimentão - *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

No mundo, a mancha bacteriana do pimentão causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* é a principal enfermidade bacteriana que acomete esta cultura. Esta bactéria ataca a parte aérea da planta em qualquer fase da cultura, principalmente as folhas, onde causa sintomas de manchas necróticas, as quais comprometem a fotossíntese, e como consequência a produção e a qualidade dos frutos é afetada negativamente (JONES et al., 2004; SILVA et al., 2006; COSTA et al., 2002).

No Brasil existem diferentes raças de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, apresentando genes de avirulência avrBs2 (raça 8), avrBs1 e avrBs2 (raça 2) na Região Nordeste e com os genes avrBs2 e avrBs3 (raça 7), e avrBs1 e avrBs2 (raça 2) no Brasil Central. Também, há presença de genes avrBsP (raça T1) e avrBsT (raça T2) na Região Nordeste e Brasil-Central. Entretanto, o primeiro relato de ocorrência de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* infectando naturalmente o pimentão corresponde às raças 7 e 8 (QUEZADO-DUVAL, 2003).

O desenvolvimento da mancha foliar de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* é favorecido por temperaturas entre 20 e 30 °C, alta umidade relativa e chuvas associadas a ventos fortes. Similar às outras espécies de *Xanthomonas*, seu ciclo inicia com a sobrevivência de células bacterianas em seu próprio hospedeiro, hospedeiros alternativos ou restos culturais. Já sua disseminação ocorre através de respingos de água que removem células bacterianas da fonte de inóculo para posteriormente disseminá-las para outras plantas (ZHANG et al., 2009; KIMURA, 1984).

Uma vez disseminadas e mediante um filme de água na superfície foliar, as células bacterianas infectam a planta através de ferimentos, pequenas lesões causadas pelo vento, chuvas e insetos, ou através de aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas ou nectários, para posteriormente colonizar a câmara subestomática e as camadas superiores do tecido do mesófilo. Uma vez que a bactéria coloniza o mesófilo, ocorre aumento de massa celular bacteriana que resultará na colonização de tecidos adjacentes, de onde as células bacterianas

conseguirão obter água e nutrientes por meio de hormônios, toxinas e enzimas (ZHANG et al., 2009; KIMURA, 1984).

A colonização dos tecidos adjacentes resulta no aparecimento de sintomas de manchas foliares dentre 1,6 e 6,4 mm de diâmetro, que gradualmente se transformarão em lesões necróticas marrom-escuras a pretas, centro deprimido cinza claro, e em alguns casos as lesões apresentam bordas salientes rodeadas por halos amarelos (OSDAGHI, 2016). Em casos graves, os tecidos no centro da lesão tornam-se secos e caem, levando ao sintoma de “shot-hole” (RITCHIE, 2000). Folhas com numerosas manchas necróticas apresentam detrimento da taxa fotossintética e abscisão prematura. Já nos frutos, os sintomas desta bactéria aparecem como lesões salientes e embranquecidas que evoluem para manchas necróticas (SCORTICHINI et al., 2013).

Outra importante estratégia de virulência da *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* é a supressão da imunidade da planta mediante efetores de secreção do tipo T3S. Esses efetores interferem nos processos celulares da planta afetando vias de sinalização imunológica como a cascata de sinalização de quinases ou suprimindo a morte celular induzida por componentes da ETI (*effector-triggered immunity*), além de vários pares de genes *R/avr* (POPOV et al., 2016).

Para o controle dessa bacteriose na cultura de pimentão, são utilizadas cultivares resistentes, realização de práticas de manejo cultural e uso de produtos de proteção fitossanitária, este último sem dúvida caracterizando-se por aumentar os custos de produção e intensificar a pressão de seleção de populações bacterianas resistentes (MARINGONI e KIMATI, 1987). A maioria de cultivares de pimentão resistentes à mancha bacteriana apresentam resistência baseada em seis genes dominantes (Bs1, Bs2, Bs3 e Bs4, Bs7 e BsT), os quais ao reconhecer genes de avirulência da bactéria, ativam na planta o mecanismo de defesa da reação de hipersensibilidade (RH), o qual se caracteriza pela morte celular programada ao redor do sítio de infecção para impossibilitar a propagação do patógeno (JONES et al. 1998; STALL et al., 2009).

Embora a maioria de cultivares de pimentão resistentes à mancha bacteriana apresentam RH como mecanismo de resistência, este não é eficiente contra raças de bactérias que não apresentem nenhum gene de avirulência (DAMICONE et al., 2021; POTNIS et al., 2019). Além disso, genes de avirulência da bactéria que se encontram

localizados nos plasmídeos podem apresentar mutações e serem transferidos para novas gerações de bactérias, tornando a resistência genética instável (ROMERO et al., 2002).

Apesar da disponibilidade de cultivares de resistentes à mancha bacteriana, estes não apresentam sucesso sem o uso de medidas adicionais como o controle químico (POTNIS, 2019). Sabe-se que o controle químico dessa bacteriose tem sido realizado com produtos à base de cobre em combinações com antibióticos, sulfato de estreptomicina e oxitetraciclina, não obstante a resistência da bactéria a estes produtos, se tornou um obstáculo no manejo da doença no mundo inteiro (OSDAGHI et al., 2016).

Por exemplo, no Brasil foram registradas ocorrências de isolados de *Xanthomonas* resistentes ao cobre por Maringoni e Kimati (1987); Aguiar et al. (2000); Strayer-Scherer et al. (2018). Os princípios ativos destes produtos intensificam a pressão de seleção de isolados bacterianos resistentes, já que a resistência a estes compostos, se encontra regulada por genes localizados nos plasmídeos, os quais podem ser transferidos para gerações bacterianas seguintes (MARINGONI e KIMATI, 1987; OSDAGHI et al., 2016). Por exemplo, o gene de avirulência *avrBs1* tem sido associado à resistência ao cobre em um plasmídeo auto transmissível (POTNIS et al., 2019).

Apesar que atualmente no Brasil e no mundo formulações à base de sulfato de estreptomicina e oxitetraciclina são de uso restrito, a ocorrência de *Xanthomonas* resistentes a estes compostos, como a produtos à base de cobre, tem acarretado problemas econômicos e ecológicos (SILVA et al., 2006). Por tais circunstâncias, métodos alternativos de controle para diminuir a severidade desta doença devem ser contemplados, como a indução de resistência, que consiste na ativação dos mecanismos de defesa da planta.

### **3.4 Indução de resistência em plantas**

A interação entre uma planta e um patógeno é uma luta pela sobrevivência, na qual as células vegetais defendem-se do patógeno através de mecanismos de natureza estrutural ou bioquímica, os quais podem ser do tipo pré-formado ou pós-formado (AGRIOS, 2005). Nesse sentido, os mecanismos do tipo pré-formado são

aqueles que existem independente da presença ou não do patógeno, e que funcionam como barreiras naturais, ou como constitutivos químicos como a cutícula, a parede celular ou inibidores químicos, que previnem e atrasam a infecção e colonização de tecidos vegetais por parte de patógenos (AGRIOS, 2005). Apesar de que alguns patógenos conseguem driblar esta primeira barreira, a planta pode ainda reconhecer o patógeno por meio de receptores de transmembrana dando lugar à ativação de seus mecanismos pós-formados para evitar a colonização por parte do fitopatógeno (PASCHOLATTI e LEITE, 1995; SOARES e MACHADO, 2007; BARROS et al., 2010).

De modo geral, plantas suscetíveis a um determinado patógeno podem produzir reações de defesa e aumentar a resistência contra infecções subsequentes como resultado de prévia exposição a patógenos, estresses físicos e analogamente em resposta ao tratamento com indutores de resistência (IR) (SMITH, 1996; ANGELOVA et al., 2006). Os IR são produtos ou compostos que ativam mecanismos de defesa latentes nas plantas, que se caracterizam por ser praticamente atóxicos para a saúde humana e para o meio ambiente, e que se diferenciam dos agroquímicos convencionais, já que não atuam diretamente sobre o microrganismo alvo, porém apresentam eficiência no controle de doenças em diferentes culturas (COLARES e BONALDO, 2014; RESENDE et al., 2007).

A ativação de respostas de defesa em plantas por meio de IR deve-se a que esses produtos ou compostos apresentam em sua composição moléculas elicitoras. As moléculas elicitoras são moléculas que ao serem reconhecidas por receptores de membrana da planta, ativam nestas um sinal local e sistêmico, que induz a planta à produção de calose, lignina, espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas, etileno, acúmulo de cálcio e ativação de genes e proteínas relacionadas à patogênese, que lhe permitiram à planta conter o avanço do patógeno (SEGONZAC e ZIPFEL, 2011; BOLLER e FELIX, 2009; CAVALCANTI, BRUNELLI e STANGARLIN, 2005). As moléculas elicitoras são de origem exógena ou endógena e do tipo abiótica, como ácido salicílico, luz ultravioleta, fosfitos, silicatos, alguns metais pesados, “terras raras” ou de natureza biótica como organismos viáveis ou componentes de suas estruturas como por exemplo polissacarídeos extraídos de microrganismos, cogumelos, crustáceos ou plantas, as quais ao serem reconhecidas pelos receptores celulares de plantas, induzem a estas à ativação de mecanismos de defesa (GUZZO; HAKAKAVA e TSAI, 2009; FONTENELLE et al., 2011; HAHN, 1999; ANGELOVA; GEORGIEV e

ROSS, 2006).

O primeiro mecanismo induzível de defesa da planta se encontra conformado por receptores de transmembrana PRRs (*Pattern recognition receptors*), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) e/ou de microrganismos MAMPs (*microbe-associated molecular pattern*) (FERRUSQUIA et al., 2021). Para o caso de fungos, os PAMPs reconhecidos pelos receptores de transmembrana são componentes essenciais de membranas como glucana, ergosterol e/ou quitina (RYAN et al., 2007). Ao passo que, os PAMPs de bactérias são lipopolisacarídeos (LPS), peptidoglicanos, a flagelina e o fator de alongação Tu (EF-Tu), que são componentes essenciais de células bacterianas (SCHWESSINGER e ZIPFEL, 2008; BOLLER e HE, 2009; OJITO-RAMOS e PORTAL, 2010).

Já o segundo mecanismo induzível de defesa da planta consiste de receptores intercelulares conhecidos como proteínas de resistência (R), as quais ao detectar efetores (proteínas de virulência microbiana AVR) ativam na planta a imunidade inata por efetores ETI (*effector-triggered immunity*), a qual se encontra associada à morte celular programada no local de infecção, conhecida como resposta de hipersensibilidade (RH), que se caracteriza pela alcalinização do citoplasma e perda da integridade e viabilidade da célula, devido ao fluxo excessivo de íons, espécies reativas de oxigênio e fitoalexinas através da membrana plasmática vegetal (NGUYEN et al, 2021; MARTIN; BOGDANOVE; SESSA, 2003; TEPER et al., 2014).

### **3.5 Mecanismos de defesa em plantas**

Agentes abióticos e bióticos promovem nas plantas o estresse oxidativo e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como o radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que podem induzir à morte celular através da peroxidação lipídica das membranas e da desnaturação de ácidos nucleicos e proteínas (LISZKAY, VAN DER ZALM, e SCHOPFER, 2004). Contudo, a planta pode converter EROs em espécies moleculares inofensivas mediante o mecanismo de defesa antioxidante e diferentes enzimas como a enzima peroxidase (POX), catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO) ou mediante metabólitos secundários (AGRAWAL et al., 2002; NARENDRA et al., 2006; GARCÍA et al., 2012).

A peroxidase (POX) é uma enzima oxido-redutora associada à membrana e encarregada da suberização e lignificação de células vegetais como resposta de defesa ao ataque de insetos ou patógenos (CAMPOS et al., 2004; SIMON 2016; KOLATTUKUDY et al., 1992; JUNG et al., 2004; BARROS, 2010; KUHN, 2007). Essa enzima catalisa processos biológicos mediante a degradação do peróxido de hidrogênio proveniente do metabolismo do oxigênio das células para transformá-lo em água e oxigênio. Também produz modificações químicas nas paredes celulares da planta que resultam na ligação de polissacarídeos, oxidação de fenóis, regulação da alongação de células, reticulação de componentes da parede celular e catabolismo de auxinas (CAVALCANTI et al., 2005).

Já a catalase (CAT) é uma enzima cuja atividade encontra-se localizada de maneira exclusiva nos peroxissomos. Quando uma planta é exposta a diferentes tipos de estresse, esta enzima é encarregada de remover o peróxido produzido nos peroxissomos mediante a dismutação de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Em síntese, a função principal da CAT é prevenir os efeitos danosos produto das mudanças na homeostase de  $H_2O_2$  (AIRAKI et al., 2012; DEL RIO et al., 2006; GIL e TUTEJA, 2010; GAYATRIDEVI et al., 2012; MENEZES, 2009).

Por sua vez, a polifenoloxidase (PFO), também denominada como fenol oxidase, catecolase, fenolase ou catecol oxidase, é uma enzima intracelular envolvida no processo da senescência e nos mecanismos de defesa de plantas (AGRIOS, 2005; OKOT-KOTBER et al., 2002; ITAKO, 2009). De acordo com CONSTABEL et al. (1995), níveis basais da enzima se encontram principalmente no interior da célula em plastídios e tilacóides. Quando um fitopatógeno provoca na planta ruptura celular, enzimas oxidantes de fenol como as polifenoloxidases são liberadas dos tilacóides para oxidar compostos fenólicos liberados dos vacúolos produzindo assim quinonas, compostos antimicrobianos que no processo de defesa celular caracterizam-se por sua alta reatividade contra fitopatógenos (LIU et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2009).

Os metabólitos secundários contêm derivados funcionais como éteres metílicos, glicosídeos e anéis aromáticos de fenóis com potencial antimicrobiano, que contribuem para a defesa da planta. Além disso, estes metabólitos se encontram ligados com a pigmentação, crescimento e reprodução das plantas (OKOT-KOTBER et al., 2002).

Sem dúvida, as moléculas de sinalização de ácido salicílico (AS), ácido

jasmônico (Aj) e etileno (ET) se encontram envolvidas na refinada rede de defesa da planta, permitindo a esta produzir um arsenal de defesa como resposta contra patógenos como as proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), as quais são codificadas por genes específicos (PINTO, 2011; RESENDE et al., 2007; FONTENELLE et al., 2011).

As PRP's foram descritas pela primeira vez em plantas de fumo como macromoléculas que se expressam sob condições de estresse biótico e abiótico e que se encontram envolvidas no fenômeno da resistência induzida, atuando de forma direta no combate dos patógenos ou de forma indireta, mantendo a estrutura e as funções da célula (JONES e DANGL, 2006; VAN LOON e VAN KAMMEN, 1970; ROMEIRO, 2008). Estas macromoléculas são classificadas como proteínas de baixa massa molecular, resistentes a proteases e solúveis em meios ácidos (GUZZO, 2004).

De acordo com Van Loon et al. (2006), existem 17 famílias de PRPs classificadas conforme a suas propriedades bioquímicas e moleculares das quais as mais estudadas são as PR1, PR-2 ( $\beta$ -1,3 glucanases), PR-3 (quitinases) e PR 5 (osmotina). Das PRPs, as  $\beta$ -1,3 glucanases e quitinases caracterizam-se por sua ação lisozímica, já que atuam na desorganização da parede celular de fitopatógenos.

A  $\beta$ -1,3 glucanase (PR-2) é uma proteína sintetizada intracelularmente ou extracelularmente, que se encontra envolvida com a divisão celular e o transporte de matérias através dos plasmodesmas (BALASUBRAMANIAN et al., 2012). Esta proteína apresenta ação direta contra patógenos hidrolisando as paredes celulares dos mesmos, atuando especificamente sob ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3 para liberar fragmentos glicosídicos da parede celular do patógeno e da própria planta, que inclusive servirão como eliciadores de defesa para o hospedeiro (BAUERMEISTER et al., 2010; MARTINS et al., 2008; VAN LOON e VAN STREIEN, 1999; ITAKO, 2009).

Já as quitinases (PR-3) têm sido relatadas como proteínas que inibem o crescimento de fungos mediante a hidrólise de polissacarídeos de quitina da parede celular. Também estas são caracterizadas por apresentar ação antibacteriana, devido a sua ação lisozômica sobre as paredes celulares bacterianas (CAVALCANTI et al., 2006). De acordo com Dalla Costa; Lovato e Sete (2010), as quitinases se acumulam no apoplasto das células vegetais para impedir o avanço e desenvolvimento do patógeno. Romeiro (2008) afirma que as glucanases acopladas com as quitinases agem sinergicamente para diminuir o crescimento do patógeno.

Além das proteínas supracitadas, a fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma proteína cuja atividade aumenta como resposta a diferentes fatores abióticos e bióticos como baixas temperaturas ou infecção por fungos (BENKEBLIA, 2000; KOMBRINK e SOMSSICH, 1995; JUNG et al., 2004). A FAL é a proteína encarregada pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em amônia e ácido transcinâmico, este último relacionado com a formação de ésteres, coumarinas, flavonoides e fitoalexinas fenólicas. Além disto, à FAL é atribuído o incremento na biossíntese de derivados de fenilpropanóides necessários para a formação de lignina que lhe confere resistência e maior rigidez às células contra a degradação causada pelos patógenos (CHEN e MCCLURE, 2000).

### **3.6 Indutores de resistência**

#### **3.6.1 Acibenzolar-S-metil**

Um das moléculas que ativam mecanismos de defesa de plantas é o ácido salicílico (AS). O acibenzolar-S-metil (ASM), um derivado do ácido benzo 1,2,3 tiadiazol-7-carbotioico-S-metil éster (BTH), é uma molécula sintética análoga ao AS, que induz resistência às plantas. O ASM foi desenvolvido para controlar patógenos em pós-colheita e aumentar a capacidade de armazenamento, por não apresentar efeito tóxico e ser completamente degradado nos tecidos vegetais. Atualmente, o ASM tem sido a molécula mais estudada na ativação de defesas de plantas, já que promove proteção em plantas contra um amplo espectro de patógenos, como também ao estresse hídrico (HUANG et al., 2022).

Produtos comerciais como Actigard® e BION® (Syngenta), que apresentam o ASM como ingrediente ativo, não exercem ação direta contra patógenos, contudo ativam a resistência sistêmica adquirida (SAR) de plantas, a qual confere proteção contra um amplo espectro de patógenos (SYNGENTA, 2022). No Brasil, o Bion® está registrado para o controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) em algodão, clorose variegada (*Xylella fastidiosa*) em citros, bacterioses (*Xanthomonas axonopodis* e *Pseudomonas cichori*) em eucalipto, crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) em feijão, mancha aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) em melão e pinta bacteriana

(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) e mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) no tomateiro (AGROFIT, 2022).

Por exemplo Soylu, Baysal e Soylu (2003) encontraram que o ASM pulverizado em plantas de tomate reduziu a severidade do cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis*) em função do aumento da atividade de peroxidases nas plantas. Lima et al (2017) relataram que a aplicação do ASM aumentou a atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase, e reduziu a severidade do cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) em plantas de uva. Também Doungous et al. (2021) relataram que o ASM atrasou o aparecimento dos sintomas do vírus do mosaico da mandioca (ACMV) e induziu resistência a seu vetor da mosca branca (*Bemisia tabaci*). De modo similar a produtos comerciais à base de ASM, também existem evidências de moléculas eliciadoras de origem abiótica, como por exemplo ácido salicílico, fosfitos, silicatos, ou de natureza biótica como polissacarídeos provenientes de cogumelos, crustáceos, plantas ou leveduras (GUZZO; HAKAKAVA e TSAI, 2009; FONTENELLE et al., 2011; HAHN, 1999; ANGELOVA; GEORGIEV e ROSS, 2006).

### **3.6.2 *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como a levedura do fermento do pão, tem sido usada na China desde 7000 a.C para o processo de fermentação de bebidas alcoólicas como o vinho (GEIJER et al., 2022). Contudo, só em 1857 Louis Pasteur comprovou que *S. cerevisiae* é responsável por diferentes processos de fermentação, e desde então essa levedura se tornou indispensável na indústria de alimentos e produção de etanol. Já em 1996 seu genoma foi completamente sequenciado, e este organismo passou a ser o modelo eucarioto mais estudado pela biologia (BAI et al., 2022).

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo ascomiceto, unicelular, que se reproduz mediante brotamento ou fissão, e que habita ambientes artificiais e naturais aonde utiliza carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos como fontes de carbono e energia (MUKHERJEE et al., 2020; ZHANG, NIELSEN, LIU, 2021). Além disso, apresenta capacidade para competir com outros microrganismos em nichos ricos em açúcar devido a sua capacidade de metabolizar eficientemente açúcar por meio de

fermentação anaeróbica para produzir etanol e CO<sub>2</sub> (HU et al., 2019).

Em condições de laboratório, *S. cerevisiae* cresce como diploide e se reproduz clonalmente por brotamento. A fase meiótica dessa levedura acontece devido à limitação de nutrientes como o nitrogênio, que deriva na formação de ascos com quatro ascósporos haploides e de paredes espessas, que se reproduzem mitoticamente por brotamento, contudo a fase haploide apresenta um curto período do ciclo de vida (BAI et al., 2022). Já a composição das paredes desta levedura consiste principalmente de polímeros de manose,  $\beta$ -glucanas e em menor proporção N-acetil-glucosamina e quitina, todos estes com diferentes graus de polimerização, tamanho e peso molecular (AGUILAR-USCANDA e FRANÇOIS, 2003).

*S. cerevisiae* se caracteriza por ser facilmente encontrada na natureza principalmente na superfície de plantas como folhas e frutos, por apresentar tolerância a condições adversas, facilidade para ser domesticada e manipulada geneticamente sobre condições de seleção artificial, e por não apresentar risco para a saúde humana (BAI et al., 2022). Diante disso, isolados desta levedura são utilizados na indústria de alimentos e cosméticos, como na produção de biossurfactantes e emulsificantes, que servem para melhorar a homogeneidade e reduzir a tensão superficial entre substâncias (RIBEIRO, GUERRA e SARUBO, 2020).

Além de cumprir um papel significativo na produção de biocombustíveis, medicamentos, cosméticos e alimentos, a levedura *S. cerevisiae* também desempenha um papel importante na agricultura, atuando como agente bioestimulante mediante a síntese do fitohormônio ácido indol-3-acético (IAA), que promove o crescimento de plantas, e atuando como agente de biocontrole através de mecanismos como a competição, o parasitismo e a antibiose (FU et al., 2016). Como agente de biocontrole, *S. cerevisiae* fornece uma barreira mecânica entre a superfície de plantas e patógenos, devido a seu poder de adesão entre células e a sua capacidade de formar biofilme sobre a superfície das plantas (VERSTREPEN e KLIS, 2006; FREIMOSER et al., 2019).

Somado ao anterior, componentes essenciais de membranas e paredes celulares desta levedura como a glucana, o ergosterol e/ou quitina atuam como eliciadores dos mecanismos de defesa da planta (PICCININ; DI PIERO e PASCHOLATI, 2005; ZANARDO, PASCHOLATI e FIALHO, 2009). Uma das maneiras de obter componentes elicitores de *S. cerevisiae* é mediante o filtrado ou a

precipitação etanólica de suspensões celulares desta levedura (WULFF e PASCHOLATI, 1998).

Diferentes pesquisas têm evidenciado o potencial de *S. cerevisiae* no controle de diferentes doenças de plantas. Por exemplo Piccinin, Di Piero e Pascholati (2005) relataram que esta levedura foi eficiente no controle de *Colletotichum graminicola* em sorgo. Por sua vez, Ferraz, Cássio e Lucas (2019) observaram que essa espécie de levedura atuou contra *Monilophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa do cacauero. Já Osman et al. (2020) relataram que ela apresenta um efeito supressor contra o nematoide *Meloidogyne javanica* causador de galhas em amendoim. Essas pesquisas atribuíram seus resultados à capacidade da levedura por sintetizar compostos antibióticos, e a sua habilidade de competir contra patógenos por espaço e nutrientes no filoplano de diferentes plantas.

### 3.6.3 Babosa (*Aloe barbadensis* Miller)

A babosa (*A. barbadensis* M.), pertencente à família Aloaceae, é uma planta de origem africana, considerada uma importante planta medicinal em muitos países aonde se utiliza principalmente suas fontes líquidas como o látex amarelo e o gel claro proveniente das células parenquimáticas da folha (HASANUZZAMAN et al., 2008; REYNOLDS, 2004; NI et al., 2004). As propriedades biológicas do gel da babosa são aproveitadas pela cosmetologia e a medicina, devido a sua capacidade curativa, profilática, efeito inibidor de inflamação e ação contra alguns fungos e bactérias (HAMMAN, 2008; RAMACHANDRA e SRINIVASA, 2008; RAEI et al., 2014).

Por outra parte, tem sido reportado que a babosa é uma planta rica em compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos e polissacarídeos que apresentam efeitos contra fitopatógenos (REYNOLDS e DWECK, 1999). Entre os polissacarídeos encontrados na babosa, a acemanana é a principal substância ativa da planta, a qual se constitui de resíduos de manose e glucose unidos por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (FEMENIA et al., 1999).

Diferentes autores reportam o efeito da babosa contra diferentes patógenos. Por exemplo, Rosca-Casian et al. (2007) reportam um efeito inibitório da babosa contra *Fusarium oxysporum*, *Penicillium gladioli*, *Botrytis gladiolorum* e *Heterosporium pruneti*. De Rodriguez et al. (2005) comprovaram que frações líquidas do gel de folhas

de babosas inibem o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum coccodes* em plantas de batata. Luiz et al. (2012) e Luiz; Rocha Neto e Di Piero (2015), estudando o patossistema tomate (cv. Santa Cruz Kada) x *Xanthomonas gardneri*, encontraram que uma suspensão de 1,5 mg. mL<sup>-1</sup> de polissacarídeos extraídos de babosa não apresentou um efeito antimicrobiano direto contra este patógeno, mas reduziu a severidade da doença bacteriana, aumentando a atividade de peroxidases, polifenoloxidase e glucanases nas plantas tratadas.

## Referências

AGRAWAL, G. K., RAKWAL, R., JWA, N. S., & AGRAWAL, V. P. Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (OsPHGPX) gene in seedling leaves. **Gene**, vol. 283, no 1, p. 227-236, 2002.

AGRIOS, George N. Plant pathology. Elsevier, 2005.

AGROFIT. Acesso em [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)

AGUIAR, L. A., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. D. L. D., AKIBA, F., CARMO, M. G. F. D. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. **Horticultura Brasileira**, vol. 21, no 1. 2003.

AGUIAR, L., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. L. D., AKIBA, F., CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Agronomia**, vol. 34, no 1. 2000.

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANCOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in applied microbiology**, v. 37, n. 3, p. 268-274, 2003.

AIRAKI, M., CORPAS AGUIRRE, F. J., MARTÍNEZ, P., MANUEL, J. Función de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) en plantas de pimiento ("Capsicum annum" L.) durante el desarrollo y en estrés por baja temperatura. Editorial de la **Universidad de Granada**. 2012.

AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., & BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia–Volume 1: Princípios e Conceitos. São Paulo: **Editora Agronômica Ceres Ltda**, 2011.

ANGELOVA, Z.; GEORGIEV, S., ROSS, W. Elicitation of plants. **Biotechnol. Biotec**, v. 20, p. 72-83. 2006.

ARAÚJO, J. M. A.; **Química de Alimentos** – Teoria e Prática. 4. ed. Viçosa: editora: UFV, 2008.

AREAS, M. S., GONÇALVES, R. M., SOMAN, J. M., SAKATE, R. K., GIORIA, R., DA SILVA JÚNIOR, T. A., MARINGONI, A. C. Prevalence of *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 11-12, p. 1050-1054, 2015.

BAI, F. Y., HAN, D. Y., DUAN, S. F., & WANG, Q. M. The ecology and evolution of the Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, v. 13, n. 2, p. 230, 2022.

BALASUBRAMANIAN, V., VASHISHT, D., CLETUS, J., & SAKTHIVEL, N. Plant  $\beta$ -1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. **Biotechnology letters**, v. 34, p. 1983-1990, 2012.

BARAK, J. D., VANCHEVA, T., LEFEUVRE, P., JONES, J. B., TIMILSINA, S., MINSAVAGE, G. V., KOEBNIK, R.. Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1805, 2016.

BARBIERILL, M. V. B. R. L., HEIDENIV, R. S. N. G., DE CARVALHOIII, F. I. F. Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. **Ciência Rural**, vol. 40, no 6, p. 1264-1269. 2010.

BARROS, F. C., SAGATA, É., DE CASTRO FERREIRA, L. C., JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. Induction of resistance in plants against phytopathogens. **Bioscience Journal**, v. 26, n.2. 2010.

BAUERMEISTER, A., REZENDE, M. I., GIESE, E. C., DEKKER, R. F. H., DE MELO BARBOSA, A. beta-(1, 3)-Glucanases Fúngicas: Produção e Aplicações Biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.31, n.2, p. 75-86. 2010.

BEKELE, D. Opportunities and Potential of hot pepper (*Capsicum annum* L.) production in Ethiopia. **European Journal of Agriculture and Forestry Research**, v. 10, n. 2, p. 14-20, 2022.

BENKEBLIA, N. Phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, pyruvic acid and total phenolics variations in onion bulbs during long-term storage. **LWT-Food Science and Technology**, vol. 33, no 2, p. 112-116. 2000.

BIANCHINI, R. e PENTEADO, M.V.C. Carotenóides de pimentões amarelos (*Capsicum annum* L.). Caracterização e verificação de mudanças com o cozimento. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, 18 (3), 1998.

BOLLER, T., FELIX, G., GEORG. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 379-406, 2009.

BOLLER, T., & HE, S. Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 742-744, 2009.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39. Brasília. 2004.

CARVALHO, S. D. Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. **Embrapa Hortaliças**, 2003.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R.; Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, 264p. Piracicaba, FEALQ. p.81-124. 2005.

CAVALCANTI, F. R., DE RESENDE, M. L. V., PEREIRA, R. B., & DA SILVEIRA CARVALHO, C. P. Atividades de quitinase e beta-1, 3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 41, no 12, p. 1721-1730. 2006.

CHEN, M., & MCCLURE, J. W. Altered lignin composition in phenylalanine ammonia-lyase-inhibited radish seedlings: implications for seed-derived sinapoyl esters as lignin precursors. **Phytochemistry**, vol. 53, no 3, p. 365-370, 2000.

COLARES, M. R. N., BONALDO, S. M. Uso de biofertilizantes na indução de resistência em plantas a patógenos. In: SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; DA SILVA, C.M.; MAIA, A.J.; FARIA, C.M.D.R.; COLELLA, J.C.T.. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. VII ed. Maringá: Suprema Gráfica e Editora Ltda, v. 1, p. 55-72. 2014.

CONSTABEL, C. P., BERGEY, D. R., RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, n.2, p. 407-411. 1995.

COSTA, R. A., RODRIGUES, R., SUDRÉ, C. P. Resistência genética à mancha bacteriana em genótipos de pimentão. **Horticultura Brasileira**, vol. 20, no 1, p. 86-89. 2002.

DALLA COSTA, M., LOVATO, P. E., e SETE, P. B. Micorrização e indução de quitinases e  $\beta$ -1, 3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. **Pesq Agropec Bras**, vol. 45, p. 376-83. 2010.

DAMICONE, J., CEVALLOS, F., TRENT, M., DIAZ, C., JOHNSON, B., & HUBHACHEN, Z. Biology and management of bacterial spot of peppers in Oklahoma. **Plant Disease**, v. 105, n. 4, p. 1129-1135, 2021.

Da Silva, L. P., de Oliveira, A. C., Alves, N. F., da Silva, V. L., & da Silva, T. I. Uso de substratos alternativos na produção de mudas de pimenta e pimentão. In: **Colloquium Agrariae. ISSN: 1809-8215**. 2019. p. 104-115.

DAVIES, B.H.; SUSAN, M. e KIRK, J.T.O. The nature and biosynthesis of the carotenoids of different color varieties of *Capsicum annuum*. **Phytochemistry**, 9, 797-805, 1970.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M; J. B. BARROSO. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 330–335, 2006.

DE RODRIGUEZ, D. J., HERNÁNDEZ-CASTILLO, D., RODRIGUEZ-GARCIA, R., & ANGULO-SÁNCHEZ, J. L. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 1, p. 81-87, 2005.

DOIDGE, E. M. A tomato canker. *Ann. Appl. Biol*, v. 7, n. 4, p. 407-30, 1921.

DOUNGOUS, O., KHATABI, B., HANNA, R., TCHUANYO, M., KUATE, A. F., & FONDONG, V. N. Acibenzolar-S-methyl induces resistance against cassava mosaic geminiviruses in *Nicotiana benthamiana* and their vector *Bemisia tabaci* in cassava (*Manihot esculenta*). **Crop Protection**, v. 150, p. 105796, 2021.

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

FERRAZ, P., CÁSSIO, F., & LUCAS, C. Potential of yeasts as biocontrol agents of the phytopathogen causing cacao witches' broom disease: is microbial warfare a solution?. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1766, 2019.

FERRUSQUÍA-JIMÉNEZ, N. I., CHANDRAKASAN, G., TORRES-PACHECO, I., RICO-GARCIA, E., FEREGRINO-PEREZ, A. A., & GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. Extracellular DNA: a relevant plant damage-associated molecular pattern (DAMP) for crop protection against pests—a review. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 451-463, 2021.

FILGUEIRA, F. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, beringela e jiló**. Ufla, 2003.

FONTENELLE, A. D. B., GUZZO, S. D., LUCON, C. M. M., & HARAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma spp.* **Crop Protection**, v. 30, n. 11, p. 1492-1500, 2011.

FONTES, P. C. R., DIAS, E. N., SILVA, D. D. Dinâmica do crescimento, distribuição de matéria seca e produção de pimentão em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 94-99, 2005.

FREIMOSER, F. M., RUEDA-MEJIA, M. P., TILOCCA, B., & MIGHELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1-19, 2019.

FU, S. F., SUN, P. F., LU, H. Y., WEI, J. Y., XIAO, H. S., FANG, W. T., ... & CHOU, J. Y. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. **Fungal biology**, v. 120, n. 3, p. 433-448, 2016.

GARCIA, B.F. Estimation of genetic distances among green pepper (*Capsicum annum* L.) lines using RAPD markers and its relationship with heterosis. **Proceedings of the 16th International Pepper Conference**. Tampico, Mexico. p. 37-40. 2002.

GARCÍA, A. C., BERBARA, R. L. L., FARÍAS, L. P., IZQUIERDO, F. G., HERNÁNDEZ, O. L., CAMPOS, R. H., & CASTRO, R. N. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. **African Journal of Biotechnology**, vol. 11, no 13, p. 3125-3134, 2012.

GARDNER, M. W., & KENDRICK, J. B. Turnip mosaic. **Journal of Agricultural Research**, v. 22, n. 3, 1921.

GAYATRIDEVI, S., JAYALAKSHMI, S. K., SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.52, p. 154-161. 2012.

GEIJER, C.; LEDESMA-AMARO, R.; TOMÁS-PEJÓ, E. Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. foab071, 2022.

GILL, S. S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v.48, n.12, p. 909-930. 2010.

GURNANI, N., GUPTA, M., MEHTA, D., & MEHTA, B. K. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 462-470, 2016.

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

GUZZO, S. D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* (Doctoral dissertation, **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**, Universidade de São Paulo). 2004.

HAHN, M. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annu. Rev. Phytopathol**, v.34, p.87-412. 1999.

HAMMAN, J. H. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1599-1616, 2008.

HASANUZZAMAN M, AHAMED KU, KHALEQUZZAMAN KM, SHAMSUZZAMAN AMM, NAHAR K. Plant characteristics, growth and leaf yield of *Aloe vera* L. as affected by organic manure in pot culture. **Australian Journal of Crop Science** 2(3), 158-163, 2008.

HU, Y., ZHU, Z., NIELSEN, J., & SIEWERS, V. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* cells for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. **Open biology**, v. 9, n. 5, p. 190049, 2019.

HUANG, R., CHENG, Y., LI, C., GUO, M., ZHU, J., GE, Y., & SUN, T. Postharvest application of acibenzolar-S-methyl delays the senescence of pears by mediating the ascorbate-glutathione cycle. **Scientia Horticulturae**, v. 293, p. 110741, 2022.

IBGE. (2022). Produção de Pimentão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimentao/sp>. Accessed September 20, 2022.

IBIZA, V. P., BLANCA, J., CAÑIZARES, J., & NUEZ, F. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. **Genetic resources and crop evolution**, v. 59, p. 1077-1088, 2012.

ITAKO, A. T., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R., TOLENTINO JÚNIOR, J. B., CRUZ, M. E. S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p. 75-83. 2009.

JONES, J. B., LACY, G. H., BOUZAR, H., STALL, R. E., & SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and applied microbiology**, vol. 27, no 6, p. 755-762. 2004.

JONES, J. D., DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, P. 323-329. 2006.

JUNG, W. J., JIN, Y. L., KIM, Y. C., KIM, K. Y., PARK, R. D., & KIM, T. H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, vol. 30, no 3, p. 645-652, 2004.

KIZHEVA, Y., URSHEV, Z., DIMITROVA, M., BOGATZEVSKA, N., MONCHEVA, P., & HRISTOVA, P. Phenotypic and Genotypic Characterization of Newly Isolated Xanthomonas euvesicatoria-Specific Bacteriophages and Evaluation of Their Biocontrol Potential. **Plants**, v. 12, n. 4, p. 947, 2023.

KIMURA, O. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 113, 1984.

KOLATTUKUDY, P. E., MOHAN, R., BAJAR, M. A., & SHERF, B. A. Plant peroxidase gene expression and function. **Biochemical Society Transactions**, v. 20, n. 2, p. 333-337, 1992.

KOMBRINK, E., & SOMSSICH, I. E. Defense responses of plants to pathogens. **Advances in botanical research. Academic Press**, p. 1-34, 1995.

KUHN, O. J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros

de crescimento e produção (**Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz**). 2007.

KYEON, M. S., SON, S. H., NOH, Y. H., KIM, Y. E., LEE, H. I., & CHA, J. S. *Xanthomonas euvesicatoria* causes bacterial spot disease on pepper plant in Korea. **The plant pathology journal**, vol. 32, no 5, p. 431. 2016.

LIMA, MERIDIANA ARAUJO GONÇALVES et al. Induction of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola* in grapevine plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, 2017.

LISZKAY, A., VAN DER ZALM, E., & SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant physiology**, vol. 136, no 2, p. 3114-3123. 2004.

LIU, H., JIANG, W., BI, Y., LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v.35, n.3, p. 263-269. 2005.

LÚCIO, A. D., MELLO, R. M., STORCK, L., CARPES, R. H., BOLIGON, A. A., ZANARDO, B. Estimativa de parâmetros para o planejamento de experimentos com a cultura do pimentão em área restrita. **Horticultura Brasileira**, vol. 22, no 4, p. 766-770. 2004.

LUIZ, C., FELIPINI, R. B., COSTA, M. E. B., & DI PIERO, R. M. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 2, p. 387-393, 2012.

LUIZ, C.; NETO, AC Rocha; DI PIERO, R. M. Resistance to *Xanthomonas gardneri* in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. **Journal of plant pathology**, p. 119-127, 2015.

LUIZ, C., DA ROCHA NETO, A. C., FRANCO, P. O., & DI PIERO, R. M. Emulsions of essential oils and Aloe polysaccharides: antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 370-381, 2017.

MARINGONI, A. C.; KIMATI, H. Sensibilidade in vitro de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro a drogas. **Summa Phytopathologica**, vol. 13, no 3-4. 1987.

MARQUELLI, W. A.; SILVA, L. C. W. Irrigação na cultura do pimentão. 2012.

MARTIN, G. B., BOGDANOVE, A. J., & SESSA, G.. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 23-61, 2003.

MARTINS, E. M. F., PASCHOLATI, S. F., BRENO, L., STANGARLIN, J. R., & CIA, P. Proteínas relacionadas à patogênese. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**, p. 387-410, 2008.

MENEZES, H. Imunidade inata e específica em plantas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.30, n.2, p. 195-212. 2009.

MOREIRA, G. R., CALIMAN, F. R. B., SILVA, D. J. H., RIBEIRO, C. S. C. Espécies e variedades de pimenta. **Informe Agropecuário**, vol. 27, no 235, p. 16-29. 2006.

MOREIRA, S. O., RODRIGUES, R., ARAÚJO, M. L. D., RIVA-SOUZA, E. M., OLIVEIRA, R. L. D. Desempenho agrônômico de linhas endogâmicas recombinadas de *Capsicum annuum* L. em sistema orgânico sob cultivo protegido. *Ciência e agrotecnologia*, vol. 34, no 4, p. 886-891. 2010.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 4, p. 466-471, 2009.

MUKHERJEE, A., VERMA, J. P., GAURAV, A. K., CHOUHAN, G. K., PATEL, J. S., & HESHAM, A. E. L. Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, p. 1497-1510, 2020.

NARENDRA, S., VENKATARAMANI, S., SHEN, G., WANG, J., PASAPULA, V., LIN, Y., & ZHANG, H. The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development. **Journal of experimental botany**, vol. 57, no 12, p. 3033-3042, 2006.

LISZKAY, A., VAN DER ZALM, E., & SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant physiology**, v. 136, n. 2, p. 3114-3123, 2004.

NEITZKE, R. S., BARBIERI, R. L., RODRIGUES, W. F., CORRÊA, I. V., CARVALHO, F. I. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, vol. 28, no 4, p. 47-53. 2010.

NGUYEN, Q. M., ISWANTO, A. B. B., SON, G. H., & KIM, S. H. Recent advances in effector-triggered immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4709, 2021.

NI, Y., & TIZARD, I. R. Analytical methodology: the gel-analysis of aloe pulp and its derivatives. In: Aloes. **CRC Press** p. 129-144. 2004.

OJITO-RAMOS, K., PORTAL, O. Introducción al sistema inmune en plantas. **Biotecnología vegetal**, v. 10, n. 1, 2010.

OKOT-KOTBER, M., LIAVOGA, A., YONG, K. J., & BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol. 50, no 8, p. 2410-2417, 2002.

OLIVEIRA, F. A., DUARTE, S. N., MEDEIROS, J. F., DIAS, N. S., OLIVEIRA, M. K., SILVA, R. C., & LIMA, K. S. Nutrição mineral do pimentão submetido a diferentes manejos de fertirrigação. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 216-223, 2015.

OSDAGHI, E., TAGHAVI, S. M., HAMZEHZARGHANI, H., & LAMICHHANE, J. R. Occurrence and Characterization of the Bacterial Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on Pepper in Iran. **Journal of Phytopathology**, vol. 164, no 10, p. 722-734. 2016.

OSMAN, H. A., AMEEN, H. H., MOHAMED, M., & ELKELANY, U. S. Efficacy of integrated microorganisms in controlling root-knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting peanut plants under field conditions. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2020.

OBRADOVIC, A., MAVRIDIS, A., RUDOLPH, K., JANSE, J. D., ARSENIJEVIC, M., JONES, J. B., ... & WANG, J. F. Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 285-292, 2004.

PASCHOLATI, S. F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. p.417-454. 1995.

PICCININ, E., DI PIERO, R. M., & PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 5-9, 2005.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v.96, p.129- 133, 1997.

PINTO, M. D. S. T., RIBEIRO, J. M., e DE OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Embrapa Semiárido-Artigo** em periódico indexado (ALICE), 2011.

POPOV, G., FRAITURE, M., BRUNNER, F., & SESSA, G. Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* type III effectors inhibit flg22-triggered immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 29, no 8, p. 651-660. 2016.

POTNIS, N., BRANHAM, S. E., JONES, J. B., & WECHTER, W. P. Genome-wide association study of resistance to *Xanthomonas gardneri* in the USDA pepper (*Capsicum*) collection. **Phytopathology**, v. 109, n. 7, p. 1217-1225, 2019.

QUEZADO-DUVAL, A. M. **Diversidade de Xanthomonas spp. associadas a mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil**. 2003. Tese de Doutorado. Ph. D. Thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; LIMA, M. F.; CAMARGO, L. E. A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 695, p. 101- 108, 2004.

RAEI, M., ANGAJI, S. A., OMIDI, M., & KHODAYARI, M. Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. **Int J Biosci**, vol. 5, no 1, p. 74-81. 2014.

RAMACHANDRA, C. T., & RAO, P. S. Processing of *Aloe vera* leaf gel: a review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, vol. 3, no 2, p. 502-510, 2008.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. *Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação Transferência de Tecnologia, 2000. 113 p. RIZZO, A.A.N.; BRAZ, L.T. Divergência genética entre cinco genótipos de melão rendilhado **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.171- 173, 2000.

RESENDE, M. L. V., CAVALCANTI, F. R., SANTOS, F. S.; AMARAL, D. R.; RIBEIRO, P. M., COSTA, J. C. B., CAMILO, F. R.; ISHIDA, A. K. N., SOUZA, R. M. Novos indutores de resistência contra doenças em cafeeiro, cacauieiro, algodoeiro e tomateiro: Perspectivas de utilização. In: RODRIGUEZ, F.; ROMEIRO, R. Indução de

resistência em plantas a patógenos. **REUNIÃO BRASILEIRA DOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS**, v.3., 2007. Viçosa, Anais. Viçosa, p. 161-182. 2007.

REYNOLDS T. Aloe chemistry. In Reynolds T(ED), the genus Aloe, CRC Press, Boca Raton. Florida, USA. 39-74, 2004.

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

RIBEIRO, L. G., LOPES, J. C., MARTINS FILHO, S., & RAMALHO, S. S. Adubação orgânica na produção do pimentão. **Horticultura Brasileira**, vol. 18, no 2, p. 134-137. 2000.

RIBEIRO, B. G., GUERRA, J. M. C., & SARUBBO, L. A. Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 434, 2020.

RITCHIE, D. F. Bacterial spot of pepper and tomato. **The Plant Health Instructor**. Online publication. doi:10.1094/PHI-I-2000-1027-01. 2000.cava

ROMEIRO, R. Indução de resistência em plantas à patógenos.In: PASCHOLATI, S. F. et al Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular. 627p. **Piracicaba, FEALQ**, p.411-432, 2008.

ROMERO, A. M.; KOUSIK, C. S.; RITCHIE, D. F. Temperature sensitivity of the hypersensitive response of bell pepper to *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 92, n. 2, p. 197-203, 2002.

ROSCA-CASIAN, O., PARVU, M., VLASE, L., & TAMAS, M. Antifungal activity of Aloe vera leaves. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 219-222, 2007.

ROWELL, B., JONES, R. T., NESMITH, W., SATANEK, A., & SNYDER, J. C. Bacterial spot resistance, yield, and quality of bell and specialty peppers. **HortTechnology**, v. 11, n. 4, p. 648-657, 2001.

RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe agropecuário**, vol. 27, no 235, p. 7-15. 2006.

RYAN, C. A., HUFFAKER, A., & YAMAGUCHI, Y. New insights into innate immunity in Arabidopsis. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1902-1908, 2007.

RYLSKI, I., ALONI, B., KARNI, L., ZAIDMAN, Z. Flowering, fruit set, fruit development and fruit quality under different environmental conditions in tomato and pepper crops. **Acta Horticulturae**, v.366, p.45-55, 1994.

SCHWESSINGER, B., ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008.

SCORTICHINI, M., STEFANI, E., ELPHINSTONE, J., & BERGSMA VLAMI, M. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. **BULLETIN OEPP**, 2013, vol. 43, p. 7-20. 2013.

SEGONZAC, C., ZIPFEL, C. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 1, p. 54-61, 2011.

SILVA, D. A., ROCHA, M. C., CARVALHO, A. D. O., FERNANDES, M. D. C. A., CARMO, M. G. F. Efeito de produtos químicos e biológicos sobre a mancha bacteriana, flora microbiana no filoplano e produtividade de pimentão. **Horticultura Brasileira**, vol. 24, p. 134-140. 2006.

SIMON, J.M. Extratos vegetais e produtos comerciais no controle de *Diplocarpon rosae* e na indução de resistência em roseiras. **Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá**. 66p. 2016.

SMITH, S. H. In the shadow of a pepper-centric historiography: Understanding the global diffusion of capsicums in the sixteenth and seventeenth centuries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 64-77, 2015.

SMITH, C. J. **Tansley Review** No. 86 Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New phytologist**, v.132, n.1, p. 1-45. 1996.

SOARES, R. S. Caracterização e seleção de linhagens avançadas de pimenta do grupo Habanero (*Capsicum chinense*) para lançamento como novas cultivares. 2020.

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

SOUZA, W. P.; BRUNO, G. B. Efeito da adubação organomineral sobre a produção de pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, vol. 9, no 1, p. 60-62. 1991.

SOYLU, S., BAYSAL, Ö., & SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, v. 165, n. 5, p. 1069-1075, 2003.

STALL, R. E., BEAULIEU, C., EGEL, D., HODGE, N. C., LEITE, R. P., MINSAVAGE, G. V., & BENEDICT, A. A. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 44, no 1, p. 47-53. 1994.

STALL, R. E., JONES, J. B., & MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. **Annual review of phytopathology**, v. 47, p. 265-284, 2009.

STANGARLIN, J. R., SCHULZ, D. G., FRANZENER, G., ASSI, L., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., & KUHN, O. J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 91-98, 2020.

STRAYER-SCHERER, A., LIAO, Y. Y., YOUNG, M., RITCHIE, L., VALLAD, G. E., SANTRA, S., ... & PARET, M. L. Advanced copper composites against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot. **Phytopathology**, v. 108, n. 2, p. 196-205, 2018.

SUDRÉ, C. P., RODRIGUES, R., RIVA, E. M., KARASAWA, M., AMARAL JÚNIOR, A. D. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura brasileira**, vol. 23, no 1, p. 22-27. 2005.

SYNGENTA. Acesso em <https://www.syngenta.cl/product/crop-protection/bionr-50-wg>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4 ed. Porto Alegre: **Artmed**. 848p. 2009.

TEPER, D., SALOMON, D., SUNITHA, S., KIM, J. G., MUDGETT, M. B., SESSA, G.. *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector X op Q interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. **The Plant Journal**, v. 77, n. 2, p. 297-309, 2014.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". **Virology**, v.40, p.199-211, 1970.

VAN LOON, L. C., REP, M., & PIETERSE, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.

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

VAUTERIN, L., SWINGS, J., KERSTERS, K., GILLIS, M., MEW, T. W., SCHROTH, M. N., & HAYWARD, A. C. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 40, no 3, p. 312-316. 1990.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45, 472–489. 1995.

VERSTREPEN, K. J., & KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.

VOLOUDAKIS, A. E., REIGNIER, T. M., & COOKSEY, D. A. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 782-789, 2005.

WIERZBICKI, R. **Identificação de raças de Xanthomonas spp. patogênicas a pimentão no estado de São Paulo**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

WORTHINGTON, R. J., ROGERS, S. A., HUIGENS III, R. W., MELANDER, C., RITCHIE, D. F. Foliar-applied small molecule that suppresses biofilm formation and enhances control of copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper. **Plant disease**, v. 96, n. 11, p. 1638-1644, 2012.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F.. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 138-143, 1998.

ZANARDO, N. M. T., PASCHOLATI, S. F., & FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1499-1503, 2009.

ZHANG, Y., CALLAWAY, E. M., JONES, J. B., & WILSON, M. Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. **European journal of plant pathology**, vol. 124, no 3, p. 379-390. 2009.

ZHANG, Y., NIELSEN, J., & LIU, Z. Yeast based biorefineries for oleo chemical production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 67, p. 26-34, 2021.

#### 4 CAPÍTULO II: Mecanismos de resistência contra *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em cultivares de pimentão

##### Resumo

Com as mudanças das condições ambientais, a produção de alimentos está se tornando cada vez mais desafiadora. A obtenção de cultivares resistentes a diversos estresses abióticos e/ou bióticos pode ser uma das soluções. Neste estudo, analisou-se a resistência de três cultivares de pimentão a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, agente causal da mancha bacteriana, quando cultivados em casa de vegetação, avaliando-se a severidade da doença ao longo do tempo. Também se investigou a participação de mecanismos bioquímicos e estruturais na defesa de plantas de pimentão contra este patógeno bacteriano, a partir da determinação da atividade de enzimas antioxidantes, da quantificação de componentes da via dos fenilpropanóides e da observação do número de células com reação de hipersensibilidade (RH) ou calose, como também se analisou o teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides. Para esclarecer quais mecanismos de resistência são acionados em diferentes cultivares de pimentão contra *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, foram utilizadas plantas das cultivares All Big, Yolo Wonder e Amarelo SF. Plantas das distintas cultivares foram desafiadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (isolado 112-P) ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ) e 14 dias após da inoculação (DAI), a cada 7 dias e por um período de 28 dias, foi avaliada a severidade dos sintomas causados pela bactéria. Em outras plantas das mesmas cultivares e inoculadas da mesma maneira, foi analisada a atividade de enzimas de defesa guaiacol de peroxidase (POX), catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO), lipoxigenase (LPOX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides, o número de estômatos apresentando reação de hipersensibilidade (RH), o número de células exibindo acúmulo de calose, e os teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides. Os resultados desta pesquisa mostraram que a cultivar All Big apresentou maior suscetibilidade à doença e exibiu as maiores atividades das enzimas peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PFO) após a inoculação, quando comparada às cultivares Yolo Wonder e Amarelo SF. Já a atividade da enzima lipoxigenase (LPOX) foi superior nas plantas da cv. Amarelo SF. Não foram encontradas diferenças significativas na atividade de

fenilalanina amônia-liase (FAL), no acúmulo de compostos fenólicos, nem de flavonoides entre as cultivares. Foi observado que as plantas Amarelo SF apresentaram maior número de células com RH, enquanto All Big teve o maior acúmulo de calose. As análises fotossintéticas evidenciaram que as plantas All Big apresentaram teores superiores de clorofila *a* e *b* em plantas inoculadas. Diante desses resultados, discute-se a participação desses mecanismos no patossistema envolvendo plantas de pimentão e a bactéria *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

**Palavras-chave:** mancha foliar, mecanismos de defesa, estresse oxidativo, reação de hipersensibilidade, fenilpropanóides, pigmentos fotossintéticos.

## Abstract

With changing environmental conditions, food production is becoming more and more challenging. Obtaining cultivars resistant to various abiotic and/or biotic stresses may be one of the solutions. In this study, we evaluated the resistance of three sweet pepper cultivars to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, which is the causal agent of bacterial leaf spot, when cultivated in a greenhouse, determining the severity of the disease over time. The participation of biochemical and structural mechanisms in the defense of sweet pepper plants against this pathogen was also investigated, based on the determination of the activity of antioxidant enzymes, the quantification of components of the phenylpropanoid pathway, and the observation of the number of cells with hypersensitivity reaction (RH) or callose, as well as the content of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids. To clarify which resistance mechanisms are triggered in different sweet pepper cultivars against *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, plants of the cultivars All Big, Yolo Wonder and Amarelo SF were used. Plants of different cultivars were challenged with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (112-P isolate) (A600 nm = 0.6) and 14 days after inoculation (DAI), every 7 days and for a period of 28 days, the severity of the symptoms caused by the bacteria was evaluated. In other plants of the same cultivars and inoculated in the same way, we analyzed the activity of guaiacol peroxidase (POX), catalase (CAT), polyphenoloxidase (PFO), lipoxygenase (LPOX) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) defense enzymes, the content of phenolic and flavonoid compounds, the number of stomata showing a hypersensitivity reaction (HR), the number of cells showing callose accumulation, and the levels of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids. The cultivar All Big showed greater susceptibility to the disease and exhibited the highest activities of the enzymes peroxidase (POX) and polyphenoloxidase (PFO) after inoculation, when compared to the cultivars Yolo Wonder and Amarelo SF. The activity of the enzyme lipoxygenase (LPOX) was higher in plants of cv. Yellow SF. No significant differences were found in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, in the accumulation of phenolic compounds or flavonoids between cultivars. It was observed that the Yellow SF plants had the highest number of cells with RH, while All Big had the highest accumulation of callose. Photosynthetic analyzes showed that All Big plants had higher levels of chlorophyll *a* and *b* than inoculated plants. From these results, we discuss the participation of these

mechanisms in the pathosystem involving sweet pepper plants and the bacterium *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

**Keywords:** leaf spot, defense mechanisms, oxidative stress, hypersensitivity reaction, phenylpropanoids, photosynthetic pigments.

## 4.1 Introdução

Surtos de epidemias na agricultura têm evidenciado a importância do uso de cultivares resistentes para combater diversos estresses bióticos ou abióticos (MESAROŠ et al., 2023). Em culturas de importância econômica como o pimentão, o uso de cultivares resistentes é uma estratégia indispensável no manejo de doenças, entre elas a mancha foliar causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

A bactéria *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ataca a planta em qualquer fase de seu desenvolvimento, provocando necrose foliar, abscisão prematura de folhas e como consequência detrimento da taxa fotossintética e da produção (AGUIAR et al., 2003; MORETTI et al., 2009; WORTHINGTON et al., 2012). A mancha foliar do pimentão é controlada com o uso de cultivares resistentes e com produtos agrícolas à base de cobre e antibióticos, produtos que além de aumentar os custos de produção e serem nocivos ao meio ambiente e ao homem, também podem selecionar isolados de bactérias com sensibilidade reduzida a estes compostos (OSDAGHI et al., 2016; UTAMI, MEALE e YOUNG, 2022). No Brasil, já foram relatadas ocorrências de *Xanthomonas* resistentes ao cobre por Maringoni e Kimati (1987); Aguiar et al. (2000) e Ritchie et al. (2009).

Apesar da disponibilidade de cultivares de pimentão resistentes à mancha bacteriana causada por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, estes não apresentam sucesso sem a implementação de medidas adicionais como controle químico. A resistência genética em plantas de pimentão à mancha bacteriana de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* está associada a genes dominantes Bs, os quais ao reconhecerem genes de avirulência avrBs do patógeno, produzem na planta reação de hipersensibilidade (RH), caracterizada pela morte celular no local de infecção, como um mecanismo para impedir o avanço do patógeno às células adjacentes (STASKAWICZ et al., 1995; POPOV et al., 2016; STALL et al., 2009; JONES et al., 1998). A maioria de cultivares resistentes à mancha foliar apresentam o gene Bs2, o qual reconhece o gene de avirulência avrBs2, presente na maioria de raças desta bactéria (WIERZBICKI, 2004).

A resistência de cultivares associada a RH não é eficiente contra raças que não apresentam genes de avirulência complementares, assim, outros genes de resistência recessivos e que não estão ligados à RH têm sido identificados em pimentão como

bs5 e bs6 (DAMICONE et al., 2021; POTNIS et al., 2019; JONES et al., 2002). Contudo, a resistência vertical baseada em um único gene de resistência é a mais utilizada na redução desta doença. Apesar disso, é com a resistência do tipo horizontal governada por vários genes, que se consegue uma resistência mais eficiente e duradoura (WIERZBICKI, 2004; POTNIS, et al 2019).

A RH em cultivares de pimentão resistentes à mancha bacteriana é antecedida pela explosão oxidativa devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). As EROs, além de produzirem RH macroscópica, também agem como moléculas sinalizadoras que provocam micro-RH's em tecidos distantes, acionando na planta a resistência sistêmica adquirida (SAR), a qual é mediada pelo ácido salicílico (RESENDE, SALGADO, CHAVES; 2003).

De modo geral, as EROs apresentam efeito tóxico direto sobre patógenos fúngicos ou bacterianos, contudo, em altas concentrações estas moléculas também são tóxicas para a planta (RESENDE, SALGADO, CHAVES; 2003). As plantas para converter EROs em espécies moleculares inofensivas, utilizam diferentes enzimas antioxidantes como a enzima peroxidase (POX), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PFO), as quais evitam danos nas células das plantas mediante o sequestro e degradação de radicais livres (GUPTA, 2010).

Nas plantas, a enzima oxido-redutora POX atua como resposta de defesa ao ataque de insetos ou patógenos. Esta enzima é encarregada da suberização e lignificação das células vegetais, e de catalisar processos biológicos mediante a degradação do peróxido de hidrogênio das células vegetais para transformá-lo em água e oxigênio (CAMPOS et al., 2004; JUNG et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2005).

Outra enzima relacionada com a defesa antioxidante de plantas é a enzima CAT. A atividade de CAT encontra-se localizada de maneira exclusiva nos peroxissomos da célula vegetal, e é encarregada de amenizar os efeitos danosos produto das mudanças na homeostase de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante a dismutação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (AIRAKI et al., 2012; GIL e TUTEJA, 2010; GAYATRIDEVI et al., 2012).

Por sua vez, a PFO é uma enzima envolvida no processo da senescência e nos mecanismos de defesa das plantas e cujos níveis basais se encontram no interior das células principalmente em plastídios e tilacóides (CONSTABEL et al., 1995; AGRIOS, 2005; OKOT-KOTBER et al., 2002). Quando um fitopatógeno provoca na planta

ruptura celular, esta enzima é liberada dos tilacóides para oxidar compostos fenólicos liberados dos vacúolos produzindo assim quinonas que apresentam atividade antimicrobiana devido a sua reatividade contra fitopatógenos (LIU et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2009).

Além da POX, CAT e PFO que atuam na rota do ácido salicílico (AS), outra enzima como a lipoxigenase (LPOX), a qual age na rota do ácido jasmônico (AJ), apresenta atividade relacionada com o crescimento, desenvolvimento e senescência vegetal, como também está envolvida nas respostas de defesa da planta. Produtos resultantes da reação enzimática da LPOX com ácidos graxos e hidroperóxidos são compostos que apresentam tendência à formação de radicais livres, que podem danificar as estruturas de membranas, ou reagir com proteínas e aminoácidos do patógeno (SANZ, PEREZ, OLIAS, 1992).

Envolvida no metabolismo dos fenilpropanóides, a fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima cuja atividade também aumenta como resposta a diferentes fatores abióticos, ou bióticos como infecções por fungos ou bactérias. A FAL é encarregada pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em amônia e ácido transcinâmico, este último relacionado à formação de compostos de defesa da planta como flavonoides e fenólicos (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980).

Os fenólicos estão envolvidos na síntese de pigmentos e produtos do metabolismo secundário, derivado de reações de defesa da planta, que resultam na síntese de compostos que impedem a oxidação de lipídios (BRANDWILLIAMS CUVELIER; BERSET, 1995). Entre os compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, os quais estão relacionados com a remoção de EROs e a conservação do estado redox nas células da planta, como também estão relacionados ao transporte da auxina (JOO, BAE e LEE, 2001).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar diferentes cultivares de pimentão quanto à resistência a *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, e elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na defesa contra a mancha bacteriana, com destaque para componentes do sistema antioxidante e da via dos fenilpropanóides.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Semeadura do pimentão

Em casa de vegetação, sementes das cultivares de pimentão All Big (Feltrin®), Yolo Wonder (Feltrin®) e Amarelo SF (Feltrin®) adquiridas em lojas agropecuárias da região de Florianópolis, foram semeadas em bandejas com células preenchidas com substrato comercial Caroline®. Três semanas após a semeadura, foram transplantadas duas plântulas por vaso de 3 litros contendo solo vermelho com turfa numa proporção 3:1. As plantas foram adubadas duas vezes durante cada experimento com N-P-K (10-10-10) 10 gL<sup>-1</sup>, colocando 10 mL por vaso.

### 4.2.2 Preparo e calibração do inóculo bacteriano

O isolado 112-P de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* foi fornecido pela Embrapa Hortaliças e conservado em tampão fosfato 60 mM pH 7,0. Para a obtenção de inóculo, o isolado foi repicado em placas de petri contendo meio Nutriente Ágar (28 g.L<sup>-1</sup>) e incubado a 25 °C por 48 horas. Posteriormente, foi preparada uma suspensão bacteriana cuja absorbância foi ajustada em espectrofotômetro (Molecular Devices Beckman Paradigm Multi-Mode Microplate Reader) para 0,6 unidades a 600 nm ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ), que equivale aproximadamente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC) mL<sup>-1</sup>.

### 4.2.3 Severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em diferentes cultivares de pimentão

Neste experimento foram utilizadas plantas de pimentão das cultivares All Big, Yolo Wonder e Amarelo SF contendo sete folhas. As plantas foram inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ), na superfície adaxial e abaxial das folhas, utilizando-se um pulverizador elétrico (Vonder PEV400 400W®). Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas para promover a abertura dos estômatos e garantir a infecção. Decorridos 14 dias da inoculação, a cada 7 dias e por um período de 28 dias foi avaliada visualmente a severidade dos sintomas causados pela bactéria.

#### 4.2.4 Atividade de enzimas antioxidantes e de defesa

Para analisar a atividade de enzimas das plantas de pimentão cv All Big, Yolo Wonder e Amarelo SF inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (0,6 U.A. a 600 nm), foram coletadas a terceira e quarta folhas (de baixo para acima) nos tempos 0, 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). As folhas foram dispostas em envelope de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas no ultra freezer a -80 °C até o momento do processamento.

Para a extração de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo, isto é, guaiacol de peroxidase (POX), catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO) e lipoxigenase, 250 mg de folhas foram maceradas sob nitrogênio líquido. Ao pó resultante foram adicionados 5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 5,2, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM. A suspensão foi colocada em microtubos e centrifugadas a 14000 g a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para outros microtubos e considerado como o extrato protéico para as análises enzimáticas. Já para avaliar a atividade da enzima de defesa fenilalanina amônia-liase (FAL), as amostras vegetais foram coletadas e processadas da mesma maneira, mas utilizando tetraborato de potássio 50 mM, pH 8,8 como tampão de extração. Estas análises foram realizadas em duplicata com 4 repetições por cultivar e a unidade experimental esteve representada por um vaso contendo duas plantas.

##### 4.2.4.1 Atividade de peroxidase de guaiacol – POX

A atividade de POX foi determinada pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A reação enzimática foi conduzida a 30 °C e a mistura da reação consistiu de 35 µL de extrato enzimático adicionados em 135 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 5,2, contendo peróxido de hidrogênio (1%), e guaiacol (2%). A mudança da absorbância a 420 nm da reação foi medida a cada 30 segundos durante 3 min em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader). A atividade de POX foi expressa em U de POX.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>, onde 1 unidade de POX foi considerada a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01 unidades de absorbância.

#### **4.2.4.2 Atividade de catalase – CAT**

A atividade de CAT foi determinada segundo a metodologia de Peixoto et al. (1999), com adaptações. Para isto, 35  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático foram adicionados a 135  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 5,2, contendo peróxido de hidrogênio 50 mM. Em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader), a 30 °C e a cada 30 segundos e por 3 minutos foi medida a variação da absorção do peróxido de hidrogênio a 240 nm. A atividade específica de CAT foi expressa em U de CAT. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ , sendo 1 unidade de CAT considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorbância.

#### **4.2.4.3 Atividade de polifenoloxidase – PFO**

A atividade de PFO foi determinada mediante a quantificação da oxidação de catecol segundo a metodologia de Duangmal e Apenten (1999) com adaptações. O substrato da reação consistiu de tampão fosfato 50 mM, pH 5,2, contendo catecol 20 mM. A reação foi conduzida a 30°C, adicionando-se 35  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático em 135  $\mu\text{L}$  de substrato de reação, as leituras foram realizadas a cada 30 segundos por 3 minutos a 420 nm em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader). A atividade específica de PFO foi expressa em U de PFO. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ , sendo 1 unidade de PFO considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorbância.

#### **4.2.4.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase – FAL**

A atividade de FAL foi determinada segundo a metodologia de Falcón (2008); com adaptações. O substrato da reação consistiu de tampão tetraborato de potássio 50 mM, pH 8,8, contendo L-fenil-alanina 50Mm. A reação iniciou pela incubação a 40 °C por uma hora de 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático em 450  $\mu\text{L}$  do substrato da reação. Após a incubação, as amostras foram submetidas a banho de gelo para interromper a reação e posteriormente foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de HCL 5N e 300  $\mu\text{L}$  de água destilada. Para o branco foi adicionado tampão tetraborato de potássio 50 mM, pH 8,8 em vez de extrato enzimático. Finalmente foi realizada a leitura a 290 nm em leitor de

microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader) e os resultados foram expressos em mg de ácido transcinâmico .mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### **4.2.4.5 Atividade de lipoxigenase – LPOX**

Para determinar a atividade de LPOX nos extratos enzimáticos foi utilizada a metodologia de (AXELROD et al., 1981) com adaptações. Como substrato para a reação foi utilizado ácido linoleico 80 µmol. L<sup>-1</sup> clareado com gotas de hidróxido de sódio 0,5 N até ficar transparente. Após o clareamento a solução foi armazenada em tubos Falcom envolvidos em papel alumínio. Para as análises de atividade de lipoxigenase foram utilizados 20 µL do extrato enzimático e 100 µL de solução-estoque de linoleato de sódio. A velocidade da reação foi determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por um período de 180 segundos.

#### **4.2.4.6 Proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para isto, a 90 µL de extrato enzimático foram adicionados 60 µL do reagente Bradford e incubados por 15 minutos no escuro. Após a incubação foi realizada a leitura a 595 nm em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader). Como branco foi utilizado água destilada mais Bradford. A concentração de proteínas totais foi calculada mediante a curva padrão de albumina de soro bovino  $y = 0,0037x + 0,2363$ .

#### **4.2.4.7 Compostos fenólicos e flavonóides**

As análises de compostos fenólicos e flavonoides foram realizadas segundo a metodologia de Mccue et al. (2000) com adaptações. Foram macerados em nitrogênio líquido 150 mg de tecido foliar, com posterior adição de 3 mL de metanol acidificado a 80% (pH 2,0). O macerado foi incubado por uma hora no escuro e centrifugado por 5 min a 3500 g.

Para a quantificação de compostos fenólicos, 0,5 mL do sobrenadante do extrato centrifugado foram adicionados em 0,5 mL de metanol 95% (v/v), sob agitação em vortex. À mistura foram adicionados 1 mL de etanol 95%, 1 mL de água destilada

estéril e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 5 min, foram adicionados 0,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5% p/v). Esta mistura foi incubada por 1h no escuro e a temperatura ambiente, e posteriormente medida a absorbância a 725 nm. Os valores foram interpolados em uma curva padrão de ácido gálico (0–400 µg/mL) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de massa fresca (mg EAG/g MF).

Já para a quantificação de flavonoides, a 0,5 ml do extrato centrifugado foram adicionados 2,5 ml de etanol 99 % e 0,5 ml de solução etanólica de cloreto de alumínio a 2 %. Esta mistura foi agitada em vortex e incubada no escuro e a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente foi medida a absorbância a 420 nm. O teor de flavonoides foi expresso em mg de equivalentes de quercetina por g de massa fresca (µg EQ g<sup>-1</sup> MF), utilizando-se uma curva-padrão.

#### **4.2.5 Reação de hipersensibilidade**

Devido a que maioria de cultivares resistentes à mancha bacteriana apresentam RH como mecanismos de resistência, foi avaliada a reação de hipersensibilidade segundo a metodologia de Thordal-Christensen et al. (1997) com modificações. Discos foliares ( $\varnothing = 5,0$  mm) da terceira e quarta folha de baixo para cima foram retirados 24 horas após a inoculação (HAI). Os discos foram incubados em placas de Petri ( $\varnothing = 5,0$  cm) contendo 5 ml de solução de 3,3 - diaminobenzidina a 1mg.ml<sup>-1</sup> (DAB), por um período de 8 h. Posteriormente, os discos foram submetidos a clareamento em etanol 96 % “fervente” por 30 min e transferidos para uma solução de conservação (ácido láctico: glicerol: água, 1:1:1, v/v/v). Após estes procedimentos, os discos foram montados em lâminas de vidro e se avaliou em microscópio óptico a 400x o número de células apresentando reação de hipersensibilidade (cor marrom-avermelhada) em toda a superfície dos discos foliares. Foram utilizadas 4 repetições por cultivar, cada repetição consistiu de uma lâmina de microscopia com 3 discos foliares e a unidade experimental consistiu em um vaso com duas plantas de pimentão.

#### 4.2.6 Acúmulo de calose

O acúmulo de calose em folhas de pimentão foi realizado seguindo a metodologia de Ton e Mauch-mani (2004) com adaptações. Discos foliares ( $\phi = 5,0$  mm) da terceira e quarta folha de baixo para cima, foram retirados 24 horas após a inoculação das plantas. Os discos foram imersos em placas de Petri ( $\phi = 5,0$  cm) contendo 2,0 mL de etanol 95% por 6 h, sob leve agitação e a temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas etapas de reidratação dos discos foliares com soluções menos concentradas de etanol (70%, 30% e água destilada). Posteriormente em outras placas de petri foram adicionados os discos foliares em uma solução de azul de anilina, cobertas com papel alumínio e deixadas sob agitação leve por 2h. Os discos foliares foram montados com glicerol 50% em lâminas e se analisou o acúmulo de calose mediante microscopia de fluorescência. Foram utilizadas 4 repetições por cultivar, cada repetição consistiu de uma lâmina de microscopia com 3 discos foliares e a unidade experimental consistiu em um vaso com duas plantas de pimentão.

#### 4.2.7 Teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides de plantas de pimentão All Big, Yolo Wonder, Amarelo SF e inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

Para a quantificação dos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides de plantas de pimentão All Big, Yolo Wonder e Amarelo SF, foi utilizada a metodologia de Arnon (1949) com adaptações. Para isto, discos foliares de 5 mm foram retirados 24 e 96 horas após a inoculação (HAI). As amostras de tecido vegetal foram pesadas e acondicionadas em frascos de vidro âmbar contendo 5 mL de acetona 80%, durante 7 dias no escuro a 25°C. Ao fim deste período, realizou-se leitura em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader) a 663, 645 e 480 nm para clorofila *a*, *b* e carotenoides respectivamente. A determinação do teor de clorofila *a* foi calculada pela fórmula  $(0,0127 \cdot A_{663}) - (0,00269 \cdot A_{645})$  e de clorofila *b* pela fórmula  $(0,0229 \cdot A_{645}) - (0,00468 \cdot A_{663})$ . Já o teor de carotenoides foi determinado pela fórmula  $[(1000 \cdot A_{480}) - ((2,14 \cdot \text{clorofila } a) - (70,16 \cdot \text{clorofila } b))]/220$ . Os valores foram expressos em mg. g<sup>-1</sup> tecido fresco. Foram realizadas 4 repetições e a unidade experimental esteve representada por um vaso com duas plantas.

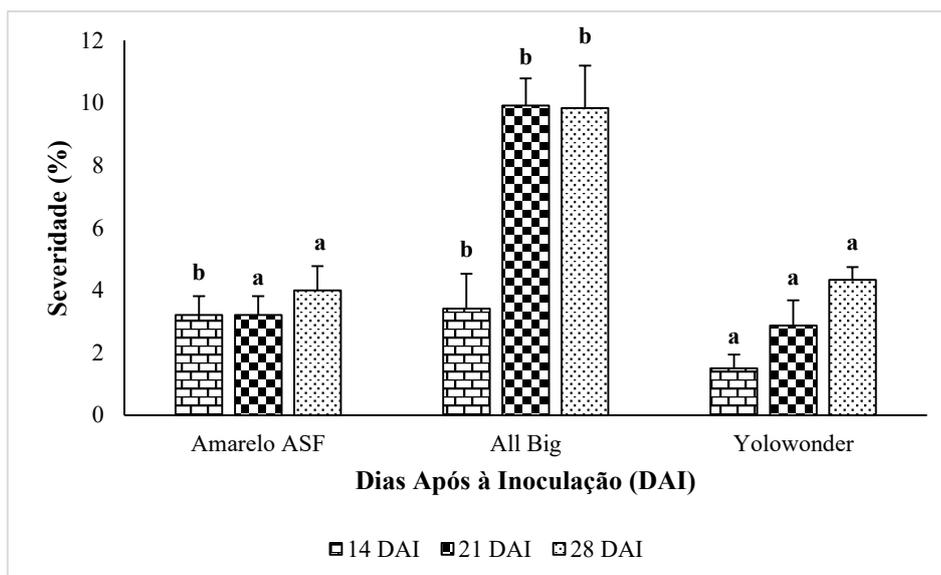
#### **4.2.8 Delineamento experimental e análise de dados**

Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em um delineamento inteiramente casualizado. A unidade experimental esteve representada por um vaso contendo duas plantas de pimentão. As análises de severidade da doença foram realizadas utilizando 6 repetições por tratamento. Já as análises de atividade enzimática, análises microscópicas e de pigmentos fotossintéticos foram realizadas com 4 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando significativo, as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). O pressuposto da homogeneidade das variâncias foi realizado pelo teste Levene. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise estatística SISVAR 5.6.

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Análise da severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em diferentes cultivares de pimentão**

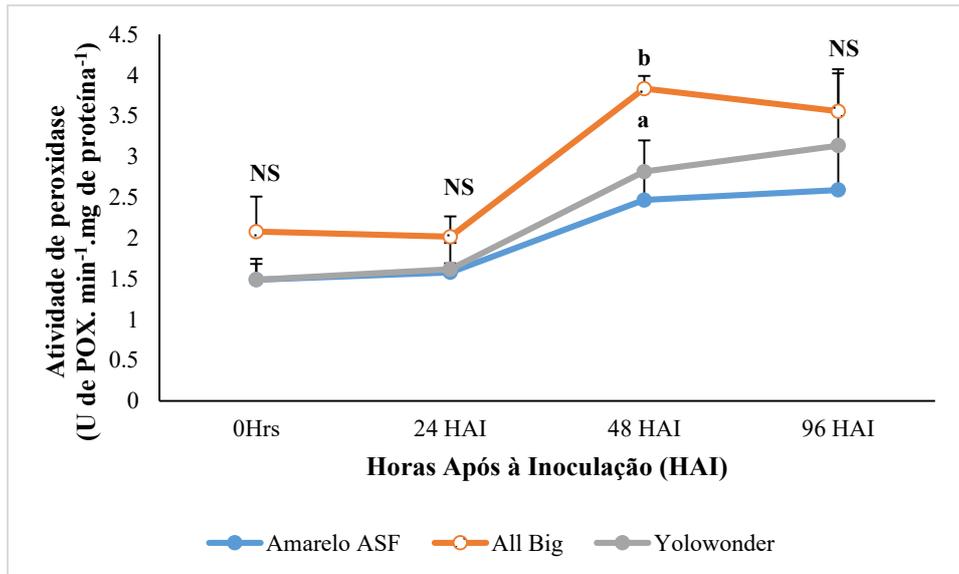
Na primeira avaliação, 14 dias após a inoculação das plantas (14 DAI), a severidade da mancha bacteriana foi similar entre All Big e Amarelo SF, mas superior à de Yolo Wonder. Nas avaliações seguintes, realizadas aos 21 e 28 DAI, a severidade da All Big aumentou consideravelmente em relação à das outras duas cultivares, ficando em média 3 vezes maior (Figura 1).



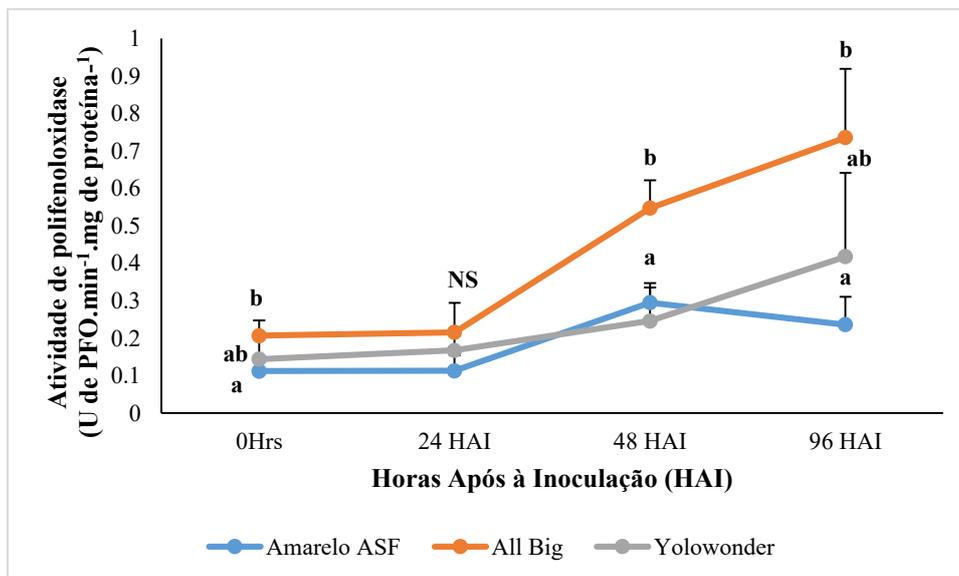
**Figura 1.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder, aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI) com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). Médias seguidas pela mesma letra, dentro do mesmo tempo de avaliação, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os dados aos 28 DAI foram transformados mediante a raiz quadrada.

#### 4.3.2 Atividade de enzimas antioxidantes e de defesa

A atividade das enzimas peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PFO) foram superiores nas plantas All Big em resposta à inoculação, em todos os tempos avaliados, quando comparadas com as atividades observadas nas plantas Amarelo SF e Yolo Wonder, embora diferença significativa para POX só tenha sido encontrada 48 horas após a inoculação (HAI), enquanto que para PFO esse fato ocorreu tanto a 48 como a 96 HAI. Não houve diferenças significativas na atividade de POX e de PFO entre as cultivares Amarelo SF e Yolo Wonder (Figuras 2 e 3).

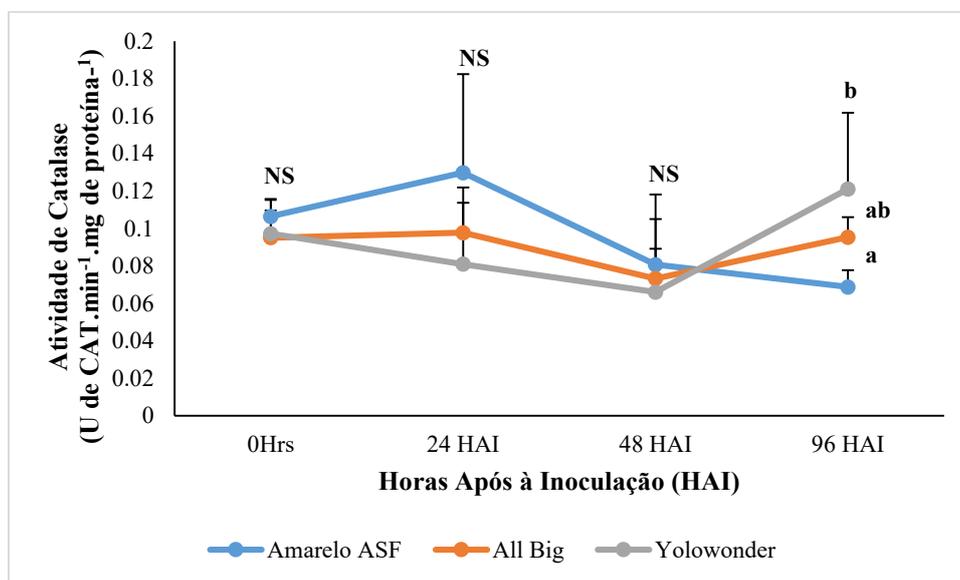


**Figura 2.** Atividade de peroxidase (POX) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo.

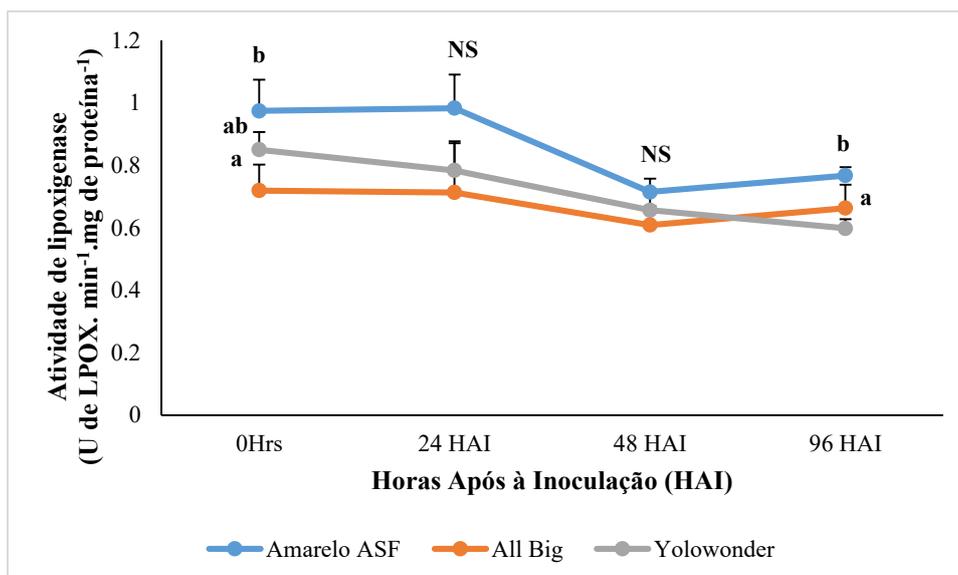


**Figura 3.** Atividade de polifenoloxidase (PFO) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo.

Em relação à catalase (CAT), foi observado que as plantas Yolo Wonder apresentaram uma atividade enzimática significativamente superior à das plantas Amarelo SF no último tempo avaliado (96 HAI). Nos demais tempos, não houve diferenças entre as três cultivares (Figura 4). Por outro lado, as plantas da cultivar Amarelo SF apresentaram maior atividade da enzima lipoxigenase (LPOX) estatisticamente superior à atividade em All Big momentos antes da inoculação das plantas (Hrs) e 96 HAI, nesse último tempo diferindo da atividade em Yolo Wonder (Figura 5).



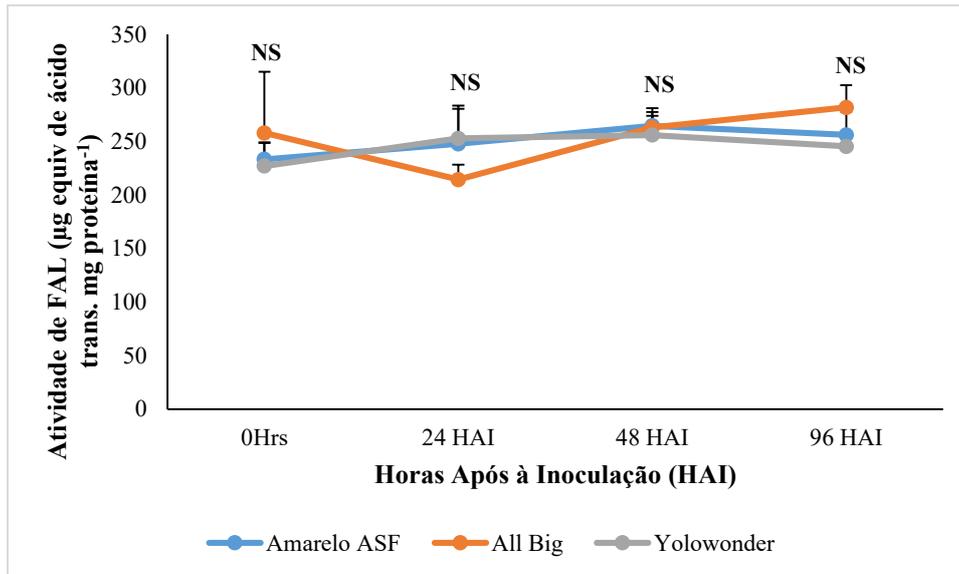
**Figura 4.** Atividade de catalase (CAT) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo. Os dados aos 28 DAI foram transformados mediante a raiz quadrada.



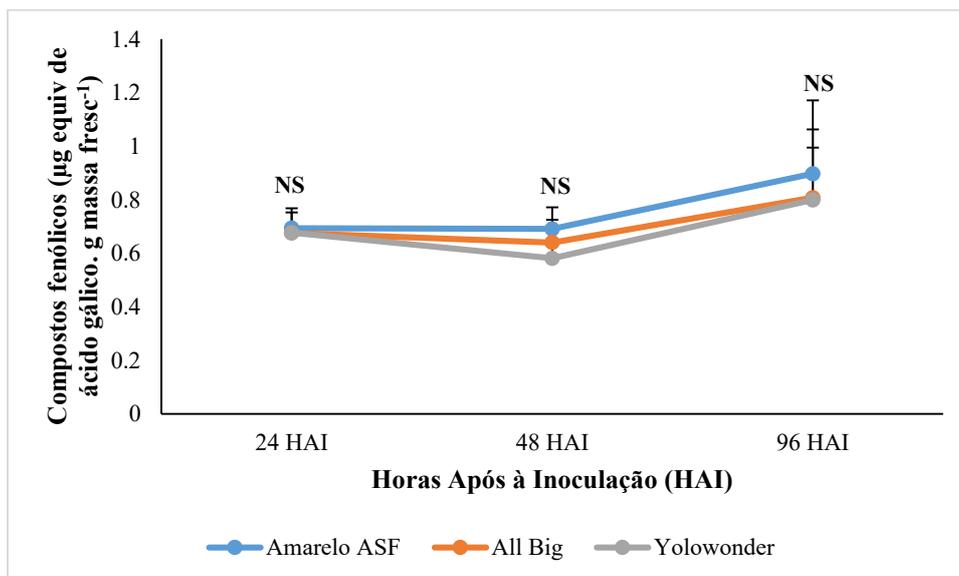
**Figura 5.** Atividade de lipoxigenase (LPOX) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo.

#### 4.3.3 Análises de componentes da via dos fenilpropanóides

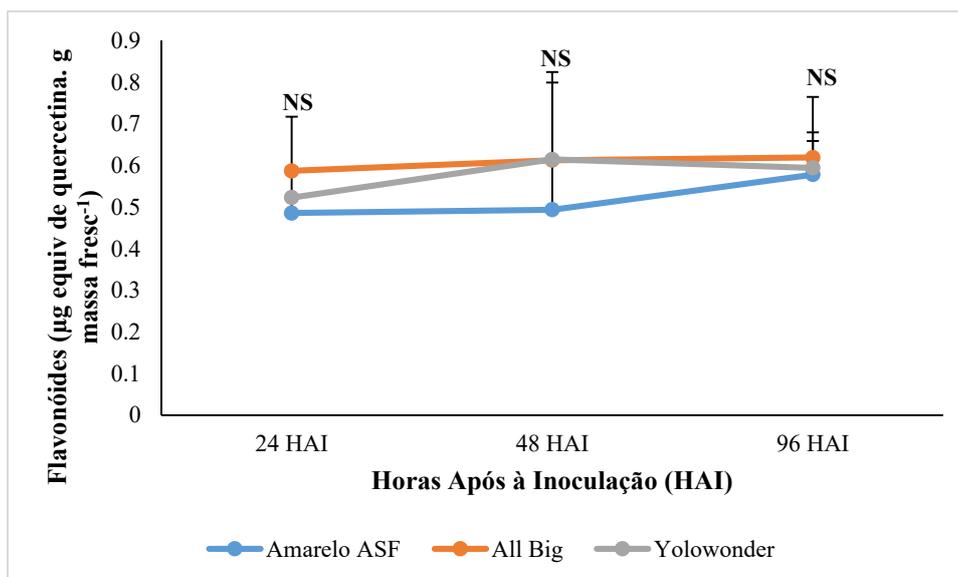
Quanto à atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (Figura 6), teor de compostos fenólicos (Figura 7) e de flavonoides (Figura 8), não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares para qualquer um dos tempos avaliados.



**Figura 6.** Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs), 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). NS: não significativo pelo teste de Tukey a 5%.



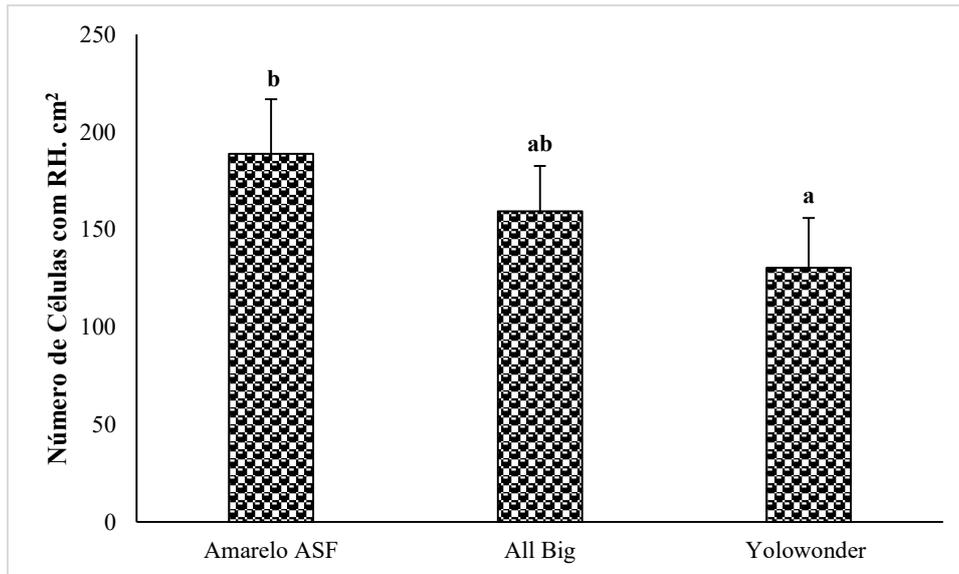
**Figura 7.** Teor de compostos fenólicos em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). NS: não significativo pelo teste de Tukey a 5%.



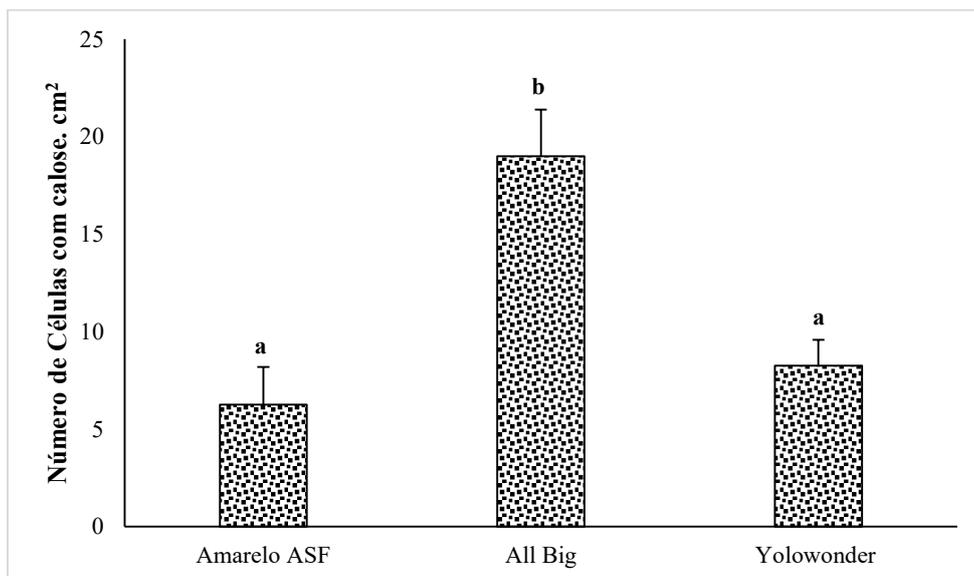
**Figura 8.** Teor de flavonóides em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24, 48 e 96 horas após a inoculação (HAI). NS: não significativo pelo teste de Tukey a 5%.

#### 4.3.4 Análises microscópicas

Quando se analisou mediante microscopia o número de células com reação de hipersensibilidade (RH) em resposta à inoculação de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, foi observado que a cultivar Amarelo SF apresentou um número superior de células com RH quando comparado com as plantas Yolo Wonder, sem diferir de All Big (Figura 9). Já o acúmulo de calose observado mediante microscopia de fluorescência 24 HAI nas folhas dos diferentes cultivares foi superior nas plantas All Big, quando comparado com as plantas Amarelo SF e Yolo Wonder que não diferiu significativamente entre si (Figura 10).



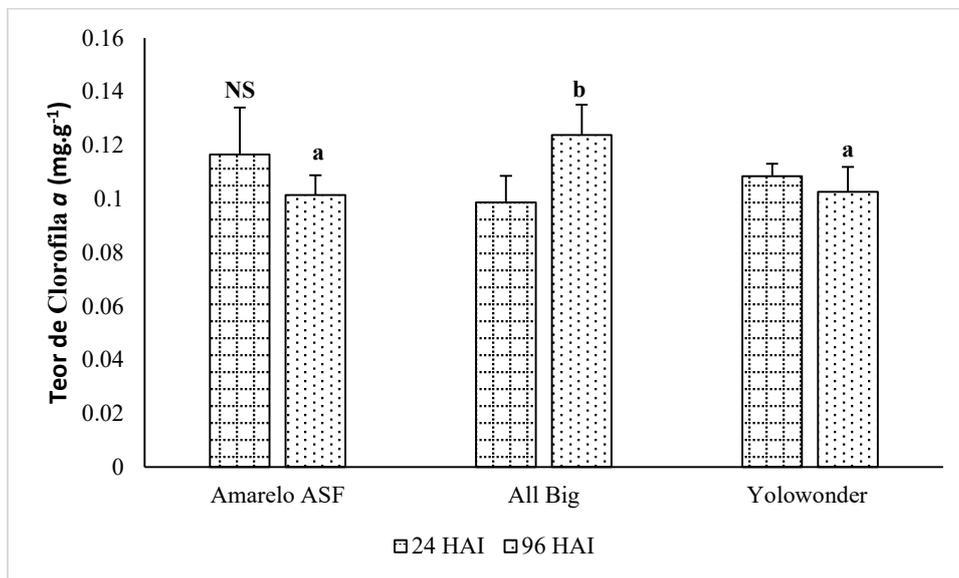
**Figura 9.** Número de células com reação de hipersensibilidade (RH) em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada 24 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.



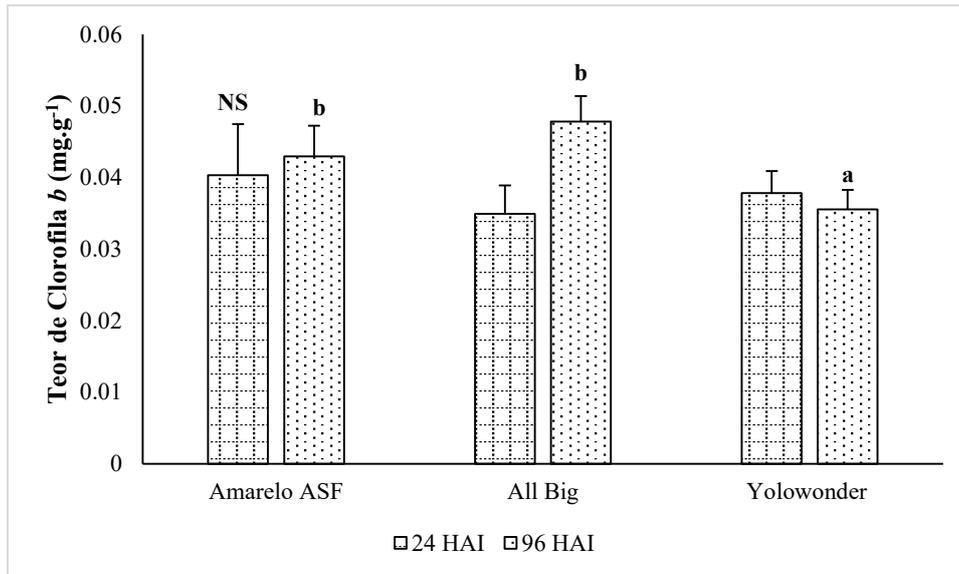
**Figura 10.** Número de células com acúmulo de calose em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada 24 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

#### 4.3.5 Pigmentos fotossintéticos

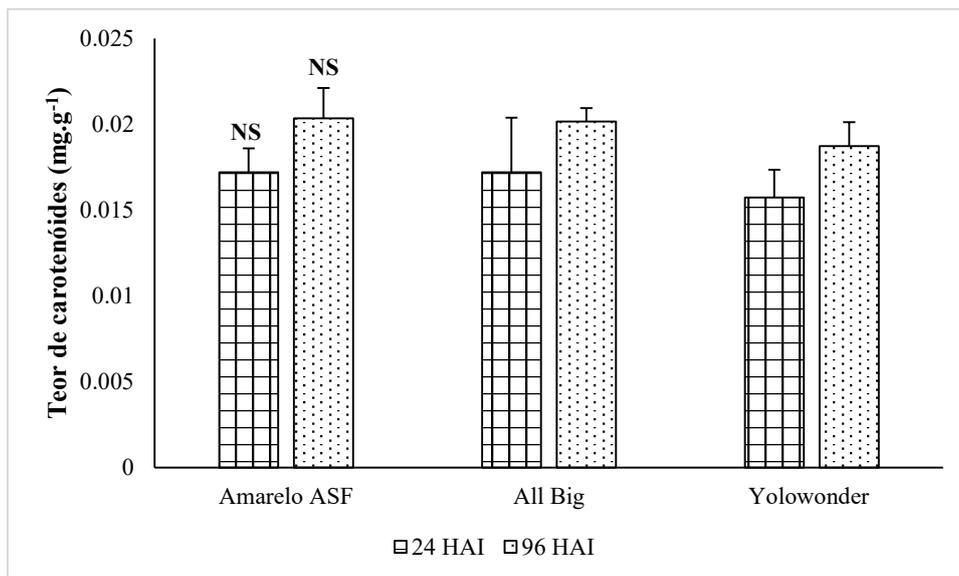
Quando foram analisados os pigmentos fotossintéticos, os teores de clorofila *a* e *b* não foram diferentes entre as cultivares 24 horas após a inoculação (HAI), mas as plantas da cultivar All Big apresentaram um teor superior de clorofila *a* quando comparado com o das plantas Amarelo SF e Yolo Wonder (Figura 11), e um teor superior de clorofila *b* em relação à Yolo Wonder (Figura 12) no tempo 96 HAI. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas no teor de carotenoides nas plantas das diferentes cultivares para qualquer das avaliações (Figura 13).



**Figura 11.** Conteúdo de clorofila *a* em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24 e 96 horas após a inoculação. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo.



**Figura 12.** Conteúdo de clorofila *b* em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24 e 96 horas após a inoculação. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo.



**Figura 13.** Conteúdo de carotenóides em plantas de pimentão Amarelo SF, All Big e Yolo Wonder inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 24 e 96 horas após a inoculação. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. NS: não significativo.

#### 4.4 Discussão

Na agricultura, a resistência genética de plantas tem sido o principal método de controle para reduzir danos causados por patógenos. A seleção de isolados capazes de quebrar a resistência de plantas é uma problemática em culturas de importância econômica como o pimentão.

Uma das doenças de grande relevância na cultura de pimentão é a mancha bacteriana de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, controlada principalmente com o uso de cultivares resistentes e de produtos à base de cobre, os quais além de gerar um impacto negativo ao meio ambiente, tornaram-se ineficazes para reduzir os sintomas da doença, devido à seleção de isolados resistentes a estes produtos (OSDAGHI et al., 2016; UTAMI, MEALE e YOUNG, 2022).

Devido à disponibilidade de diferentes cultivares de pimentão no mercado, surge a necessidade de estudar a resistência à mancha bacteriana, e elucidar os mecanismos de resistência associados, na tentativa de trazer contribuições aos programas de melhoramento genético. No atual estudo, inicialmente quando as cultivares de pimentão Yolo Wonder, All Big e Amarelo SF foram inoculados com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, foi observado que os cultivares Yolo Wonder e Amarelo SF apresentaram severidade da doença significativamente inferior às plantas da cultivar All Big (Figura 1).

A menor severidade de bacteriose nas plantas da cultivar Amarelo SF pode ter ocorrido em função da ativação da enzima lipoxigenase (LPOX) (Figura 5), a qual possivelmente auxiliou na síntese de radicais livres na planta, que poderiam ter danificado membranas e proteínas do patógeno bacteriano e isto se viu refletido na menor intensidade da doença neste cultivar. A LPOX além de estar relacionada com a síntese de compostos com atividade antimicrobiana, também está relacionada com a sinalização e ativação de mecanismos de defesa como a RH (MUNHOS et al. 2015).

Estima-se que a atividade de LPOX na cv. Amarelo SF contribuiu na redução da doença, já que ela catalisa a conversão de ácidos graxos como o ácido linoleico para convertê-lo em hidroperóxidos e oxilipinas, que são compostos com características antimicrobianas, que também se encontram envolvidos na ativação sistêmica de mecanismos de defesa da planta (DEBOEVER et al., 2020). Resultados similares foram encontrados por Hwang (2010) e Bounario & Servili (1999) que observaram que

plantas de pimentão inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* apresentaram um aumento significativo na atividade de lipoxigenase nas primeiras horas após a inoculação, e relacionaram este acréscimo com o aumento significativo de células apresentando reação de hipersensibilidade, a qual acontece como resultado da perda de água e peroxidação lipídica destas células.

Sanier et al. (2012) observaram que plantas de algodão inoculadas com *Xanthomonas campestris* apresentaram nas primeiras horas após a inoculação, expressão significativa do gene GhLOX2 que codifica lipoxigenase, e relacionaram a reação de hipersensibilidade das células das plantas com a expressão desse gene. Também Champion et al. (2009) observaram que plantas de algodão resistentes ao crestamento bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, além de apresentar necrosamento do tecido (reação de hipersensibilidade) como um mecanismo para imobilizar o patógeno, também apresentam acúmulo de SA e expressão de genes responsáveis pela síntese de etileno e de ácido jasmônico. Por outro lado, Munhoz et al. (2015) encontraram que durante as primeiras 8 horas na interação maracujá x *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, o gene de LOX2 relacionado à síntese de lipoxigenase é fortemente reprimido possivelmente devido a uma falha no reconhecimento do patógeno por parte da planta, contudo após este período é observada uma expressão significativa deste gene.

Além de apresentar a maior atividade de LPOX, a cultivar Amarelo SF também foi a que exibiu maior número de células com RH após a inoculação. Acredita-se que o maior número de células com RH em Amarelo SF limitou o avanço da bactéria nos tecidos das folhas. Diante disso, se presume que RH e a ativação de LPOX restringiram a ação da fitobactéria, resultando em menor severidade na cultivar em questão.

O maior número de células com RH em Amarelo SF possivelmente deve-se a que esta cultivar apresenta genes de resistência que reconhecem genes de avirulência do isolado de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (112P) utilizado nesta pesquisa. Contudo, outros estudos de expressão genica e interações moleculares devem ser realizados para determinar quais genes de avirulência e que moléculas da bactéria são reconhecidos por genes das plantas.

No presente estudo é provável que em todas as cultivares tenha ocorrida a ativação de algum mecanismo de resistência após o reconhecimento pela planta de algum padrão molecular associado à bactéria como lipopolisacarídeos (LPS),

peptidoglicanos, flagelina ou fator de alongação Tu (EF-Tu), resultando na síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no interior das células. Acredita-se que as plantas do cultivar Yolo Wonder conseguiram amenizar de maneira significativa os danos provocados por esta espécie reativa de oxigênio mediante um aumento significativo da enzima CAT (Figura 4), prevenindo assim a morte celular, e isto se viu refletido na redução da severidade da doença.

Já as atividades das enzimas POX e PFO foram significativamente superiores na cultivar All Big em todas as avaliações, com significância estatística em alguns tempos (Figura 2 e 3) quando comparadas com as atividades observadas nas plantas das cultivares Yolo Wonder e Amarelo SF. Entre suas funções, a enzima POX está relacionada com o fortalecimento das paredes celulares, já que se encontra envolvida na suberização e lignificação de células vegetais (BARROS et al., 2010). Contudo, plantas All Big mostraram 3 vezes mais doença que as outras cultivares. As maiores atividades de POX e PFO, especialmente nos tempos mais tardios, podem ter ocorrido na tentativa da planta eliminar os maiores níveis de espécies reativas em oxigênio acumulados em consequência do maior avanço da doença na cultivar All Big, não havendo indícios da participação dessas enzimas na resistência de pimentão a *Xanthomonas*.

Uma das hipóteses da alta severidade em All Big possa estar relacionada com um reconhecimento defeituoso ou tardio do patógeno por parte da planta, que impediu nesta a síntese de AJ, um fitohormônio que está relacionado com a produção de moléculas sinalizadoras, antimicrobianas e a produção de RH. Estima-se que em All Big a síntese de AJ foi afetada, já que nestas plantas a atividade LPOX foi menor (Figura 5) e esta enzima se encontra envolvida diretamente com a síntese deste fitohormônio. Poderia se considerar que os genes implicados na síntese de AJ possivelmente foram silenciados por moléculas efetoras do tipo T3S presentes nesta bactéria (POPOV et al., 2016), ou que estas moléculas sabotaram os receptores celulares evitando seu reconhecimento, para posteriormente interferir nos processos celulares da planta afetando as vias de sinalização relacionadas à síntese de AJ, e isto se viu refletido na alta severidade nesta cultivar. Contudo, para comprovar isto, outros experimentos mais refinados devem ser conduzidos onde se avalie a síntese de AJ e a atividade de outras enzimas relacionadas à síntese desse ácido.

Sobre a maior severidade em All Big, também se presume que possa estar relacionada com um aumento excessivo de ROS. Apesar que em All Big foi observada uma atividade de POX e PFO superior (Figura 2 e 3), a atividade de ambas as enzimas possivelmente não foi eficiente para remover as ROS a um nível que não provocasse danos às células das plantas. Embora a atividade de POX e PFO nas plantas de All Big, cultivar mais suscetível, foi significativamente superior, é importante destacar que a ativação destas enzimas pode acontecer também em cultivares resistentes e suscetíveis, como foi evidenciado por Bashan, Okon e Henis (1987) que encontraram atividade destas enzimas em plantas de tomate resistentes e suscetíveis inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*.

Quando analisado o acúmulo de calose nos três cultivares, foi observado que as plantas All Big, cultivar de maior suscetibilidade, apresentaram maior acúmulo deste composto (Figura 10), sugerindo-se que esse mecanismo não esteve relacionado com a redução da severidade da mancha bacteriana em pimentão. De modo contrário, autores como Mustafa et al. (2022) observaram que *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, uma bactéria que ataca o xilema das plantas de banana, induz ao acúmulo de calose e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em pseudocaules e cormos de plantas de bananas resistentes. De modo similar, Llorens et al (2015), avaliando ácido hexanóico na indução de resistência em laranja contra o cancro dos cítricos (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), mostraram que este produto reduziu os sintomas da doença induzindo o acúmulo de calose nas paredes celulares da planta.

Com relação à atividade da enzima FAL, e o acúmulo de compostos fenólicos e flavonoides (Figura 6, 7 e 8), não foi encontrada evidência alguma de sua participação na redução da severidade da doença para nenhum dos cultivares. Não obstante, o aumento destes compostos também tem sido observado em diferentes plantas após infecção com diferentes patógenos, já que a síntese destes compostos se relaciona com a síntese de compostos antimicrobianos como as fitoalexinas (MAZARO et al., 2008).

A inoculação de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* reduziu o teor de clorofila *a* e *b* nas plantas do cultivar Yolo Wonder (Figura 11e 12). Isto poderia estar relacionada a um custo metabólico que a planta investe para ativar algum mecanismo de defesa após o reconhecimento do patógeno como a enzima CAT, ou bem que a bactéria afeta diretamente aos cloroplastos e, por conseguinte a síntese destes pigmentos neste

cultivar. Contudo, foi observado que o teor de carotenoides entre as cultivares não se vê afetado pelo patógeno bacteriano.

#### **4.5 Conclusões**

Desta pesquisa se conclui que mecanismos de defesa de plantas, como a ativação de lipoxigenase e a reação de hipersensibilidade, estão relacionados à resistência de pimentão a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

## Referências

- AGRIOS, George N. Plant pathology. Elsevier, 2005.
- AGUIAR, L. A., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. D. L. D., AKIBA, F., CARMO, M. G. F. D. Efeito de formulações cúpricas e cuproorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria em pimentão. **Horticultura Brasileira**, vol. 21, no 1. 2003.
- AGUIAR, L., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. L. D., AKIBA, F., CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria de pimentão e tomateiro. **Agronomia**, vol. 34, no 1. 2000.
- AIRAKI, M. Función de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L) durante el desarrollo y en estrés por baja temperatura. Granada: **Universidad de Granada**, 2012.
- ARNON, D. I., & WHATLEY, F. R. ¿WHATLEY, F. R. Is chloride a coenzyme of photosynthesis? **Science**, v. 110, n. 2865, p. 554-556, 1949.
- AXELROD, B. Lipoxygenase from soybeans. **Methods enzymol**, v. 71, p. 441-451, 1981.
- BARROS, F. C., SAGATA, É., DE CASTRO FERREIRA, L. C., JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. Induction of resistance in plants against phytopathogens. **Bioscience Journal**, v. 26, n.2. 2010.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Peroxidase, polyphenoloxidase, and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in tomato plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n. 2, p. 366-372, 1987.
- BOLLER, T., & HE, S. Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 742-744, 2009.
- BUONAURO, R.; SERVILI, M. Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 54, n. 5-6, p. 155-169, 1999.

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

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39. Brasília. 2004.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R.; Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, 264p. Piracicaba, FEALQ. p.81-124. 2005.

CHAMPION, A., HEBRARD, E., PARRA, B., BOURNAUD, C., MARMEY, P., TRANCHANT, C., & NICOLE, M. Molecular diversity and gene expression of cotton ERF transcription factors reveal that group IXa members are responsive to jasmonate, ethylene and *Xanthomonas*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 4, p. 471-485, 2009.

CONSTABEL, C. P., BERGEY, D. R., & RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 2, p. 407-411, 1995.

DAMICONE, J., CEVALLOS, F., TRENT, M., DIAZ, C., JOHNSON, B., & HUBHACHEN, Z. Biology and management of bacterial spot of peppers in Oklahoma. **Plant Disease**, v. 105, n. 4, p. 1129-1135, 2021.

DEBOEVER, E., DELEU, M., MONGRAND, S., LINS, L., & FAUCONNIER, M. L. Plant-pathogen interactions: Underestimated roles of phyto-oxylinins. **Trends in plant science**, v. 25, n. 1, p. 22-34, 2020.

DUANGMAL, K., & APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.

FALCÓN, A. B., CABRERA, J. C., COSTALES, D., RAMÍREZ, M. A., CABRERA, G., TOLEDO, V., & MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A. The effect of size and acetylation

degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 103-112, 2008.

GAYATRIDEVI, S., JAYALAKSHMI, S. K., SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.52, p. 154-161. 2012.

GILL, S. S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v.48, n.12, p. 909-930. 2010.

GUPTA, N., BALOMAJUMDER, C., & AGARWAL, V. K. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 176, n. 1-3, p. 1-13, 2010.

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

HENRY, G., THONART, P., & ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **BASE**, 2012.

HWANG, I. S., & HWANG, B. K. The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. **Plant physiology**, v. 152, n. 2, p. 948-967, 2010.

JONES, J. B.; STALL, R. E.; BOUZAR, H. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. **Annual review of phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 41-58, 1998.

JONES, J. B., MINSAVAGE, G. V., ROBERTS, P. D., JOHNSON, R. R., KOUSIK, C. S., SUBRAMANIAN, S., & STALL, R. E. A non-hypersensitive resistance in pepper to the bacterial spot pathogen is associated with two recessive genes. **Phytopathology**, v. 92, n. 3, p. 273-277, 2002.

JOO, J. H., BAE, Y. S., & LEE, J. S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. **Plant physiology**, v. 126, n. 3, p. 1055-1060, 2001.

JUNG, W. J., JIN, Y. L., KIM, Y. C., KIM, K. Y., PARK, R. D., & KIM, T. H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, vol. 30, no 3, p. 645-652, 2004.

LIU, H., JIANG, W., BI, Y., LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v.35, n.3, p. 263-269. 2005.

LLORENS, E., VICEDO, B., LÓPEZ, M. M., LAPENA, L., GRAHAM, J. H., & GARCÍA-AGUSTÍN, P. Induced resistance in sweet orange against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by hexanoic acid. **Crop Protection**, v. 74, p. 77-84, 2015.

LÓPEZ-MEYER, Melina et al. La aplicación exógena de metil jasmónico aumenta la defensa inducida por micorrización arbuscular contra *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol. **Scientia fungorum**, v. 51, 2021.

MARINGONI, A. C.; KIMATI, H. Sensibilidade in vitro de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro a drogas. **Summa Phytopathologica**, vol. 13, no 3-4. 1987.

MAZARO, S. M., CITADIN, I., DE GOUVÊA, A., LUCKMANN, D., & GUIMARÃES, S. S. Induction of phytoalexins in cotyledons of soybean in response to the derivatives of leaf surinan cherry. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1824-1829, 2008.

MCCUE, P., ZHENG, Z., PINKHAM, J. L., & SHETTY, K. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 603-613, 2000.

MESAROŠ, A., NEDELJKOVIĆ, M., DANOJEVIĆ, D., MEDIĆ-PAP, S., STANKOVIĆ, S., RADOVIĆ, S., & LOZO, J. Influence of growth conditions on an antioxidative system in two bell pepper genotypes differing in susceptibility to phytopathogen bacteria *Xanthomonas euvesicatoria*. **Plant Growth Regulation**, p. 1-9, 2023.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 4, p. 466-471, 2009.

MUNHOZ, C. F., SANTOS, A. A., ARENHART, R. A., SANTINI, L., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., & VIEIRA, M. L. C. Analysis of plant gene expression during passion fruit–*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n. 1, p. 135-155, 2015.

MUSTAFA, A. S., TUGUME, B., SSENKU, J. E., SSEMANDA, P., ATHMAN, S. Y., ORYEM-ORIGA, H., ... & TUGUME, A. K. *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*

bacterial infection induces organ-specific callose and hydrogen peroxide production in banana. **PhytoFrontiers™**, v. 2, n. 3, p. 202-217, 2022.

OKOT-KOTBER, M., LIAVOGA, A., YONG, K. J., & BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol. 50, no 8, p. 2410-2417, 2002.

OSDAGHI, E., TAGHAVI, S. M., HAMZEHZARGHANI, H., & LAMICHHANE, J. R. Occurrence and Characterization of the Bacterial Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on Pepper in Iran. **Journal of Phytopathology**, vol. 164, no 10, p. 722-734. 2016.

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

POPOV, G., FRAITURE, M., BRUNNER, F., & SESSA, G. Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* type III effectors inhibit flg22-triggered immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 29, no 8, p. 651-660. 2016.

POTNIS, N., BRANHAM, S. E., JONES, J. B., & WECHTER, W. P. Genome-wide association study of resistance to *Xanthomonas gardneri* in the USDA pepper (*Capsicum*) collection. **Phytopathology**, v. 109, n. 7, p. 1217-1225, 2019.

RESENDE, M. L. V., SALGADO, S. M., & CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RYAN, C. A., HUFFAKER, A., & YAMAGUCHI, Y. New insights into innate immunity in Arabidopsis. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1902-1908, 2007.

RITCHIE, D. F., MELANDER, C., HUIGENS, R. W., ROGERS, S. A., & CAVANAGH, J. Potential for a bromoageliferin analogue biofilm inhibitor-dispersant to enhance control of phytopathogenic bacterial diseases. In **PHYTOPATHOLOGY** (Vol. 99, No. 6, pp. S108- S109). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC. 2009.

SANIER, C., SAYEGH-ALHAMDIA, M., JALLOUL, A., CLERIVET, A., NICOLE, M., & MARMEY, P. A 13-lipoxygenase is Expressed Early in the Hypersensitive Reaction

of Cotton Plants to *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 6, p. 286-293, 2012.

SANZ, L. C., PÉREZ, A. G., & OLÍAS, J. M. La lipoxigenasa en el reino vegetal. I. Propiedades. **Grasas Aceites**, v. 43, p. 231-239, 1992.

SCHWESSINGER, B., & ZIPFEL. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008.

STALL, R. E., JONES, J. B., & MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. **Annual review of phytopathology**, v. 47, p. 265-284, 2009.

STASKAWICZ, B. J., AUSUBEL, F. M., BAKER, B. J., ELLIS, J. G., & JONES, J. D. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 661-667, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4 ed. Porto Alegre: **Artmed**. 848p. 2009.

THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y., & COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1187-1194, 1997.

TON, J., & MAUCH-MANI, B.  $\beta$ -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. **The Plant Journal**, v. 38, n. 1, p. 119-130, 2004.

UTAMI, D., MEALE, S. J., & YOUNG, A. J. A Pan-Global Study of Bacterial Leaf Spot of Chilli Caused by *Xanthomonas* spp. **Plants**, v. 11, n. 17, p. 2291, 2022.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 18, n. 1, p. 259-288, 1980.

WIERZBICKI, R. **Identificação de raças de Xanthomonas spp. patogênicas a pimentão no estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.

WORTHINGTON, R. J., ROGERS, S. A., HUIGENS III, R. W., MELANDER, C., RITCHIE, D. F. Foliar-applied small molecule that suppresses biofilm formation and enhances control of copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper. **Plant disease**, v. 96, n. 11, p. 1638-1644, 2012.

## 5 CAPÍTULO III: *Saccharomyces cerevisiae* e acibenzolar-S-metil (ASM): indução de resistência em pimentão a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

### Resumo

A mancha bacteriana de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* é uma importante doença na cultura do pimentão, a qual afeta a planta em qualquer fase de seu desenvolvimento, comprometendo a produção. O controle desta bacteriose é baseado na implementação de cultivares resistentes e no uso de agroquímicos, atividades que ao longo do tempo intensificam a pressão de seleção de bactérias resistentes aos produtos disponíveis no mercado, acarretando assim problemas ambientais e à saúde humana. Diante do anterior, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito protetor e o modo de ação de suspensões celulares de *Saccharomyces cerevisiae* na redução da severidade de manchas foliares causadas por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Neste sentido, plantas de pimentão das cultivares Rubi Gigante e All Big foram pulverizadas com uma suspensão de *S. cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) e 3 dias após desafiadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (0,6 U.A. a 600 nm). Como controle negativo, as plantas foram pulverizadas com água destilada e como controle positivo foram pulverizadas com o indutor Bion (acibenzolar-S-metil - ASM) a 50 ppm do ingrediente ativo. Foram avaliadas a severidade da mancha bacteriana, as atividades de enzimas de defesa peroxidase (POX), catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO), e fenilalanina amônia-liase (FAL) e do teor de clorofila *a*, *b* e carotenóides. Em plantas de pimentão cultivar Rubi Gigante, a suspensão de levedura reduziu significativamente a severidade da doença em até 25%; já o ASM a reduziu em até 50% e aumentou significativamente as atividades de POX e PFO às 72 e 24 horas após a inoculação (HAI) respectivamente (6 e 4 dias após a aplicação do produto). A aplicação dos produtos não alterou os teores de clorofila *a*, nem de carotenóides, contudo a aplicação de levedura reduziu o teor de clorofila *b* nesta cultivar. Já na cultivar All Big, a levedura e o ASM reduziram a severidade da mancha bacteriana em 25% e 80%, respectivamente. A suspensão de levedura ativou a enzima PFO e POX aos 1 e 6 dias após a sua aplicação respectivamente (momentos antes da inoculação e 3 dias após). Pelo contrário, nessa cultivar, a pulverização com

ASM não ativou qualquer das enzimas de defesa avaliadas. Em relação aos pigmentos fotossintéticos, o ASM em All Big reduziu o teor de carotenoides, e tanto a suspensão de levedura como o ASM reduziram os teores de clorofila *a* e *b*. Os resultados mostram que ASM e a levedura *S. cerevisiae* apresentam potencial para auxiliar no manejo da doença.

**Palavras-chave:** mancha foliar, controle alternativo, levedura, mecanismos de defesa, indução de resistência, estresse oxidativo, pigmentos fotossintéticos.

## Abstract

The bacterial spot of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* is an important disease in the sweet pepper crop, which affects the plant at any stage of its development, compromising production. The control of this bacteriosis is based on the implementation of resistant cultivars and the use of agrochemicals, activities that over time intensify the selection pressure of bacteria resistant to the products available on the market, thus causing environmental and human health problems. Given the above, the objective of this research is to evaluate the protective effect and mode of action of cell suspensions of *Saccharomyces cerevisiae* in reducing the severity of leaf spots caused by *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. In this sense, pepper plants of the Rubi Gigante and All Big cultivars were sprayed with a suspension of *S. cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>) and 3 days later challenged with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (0.6 AU at 600 nm). As a negative control, the plants were sprayed with distilled water and as a positive control they were sprayed with the inducer Bion (acibenzolar-S-methyl - ASM) at 50 ppm of the active ingredient. The severity of the bacterial spot, the activities of defense enzymes peroxidase (POX), catalase (CAT), polyphenoloxidase (PFO), and phenylalanine ammonia lyase (FAL) and the content of chlorophyll a, b and carotenoids were evaluated. In red pepper cultivar Rubi Gigante, the yeast suspension significantly reduced disease severity by up to 25%; ASM reduced it by up to 50% and significantly increased POX and PFO activities at 72 and 24 hours after inoculation (HAI) respectively (6 and 4 days after product application). The application of the products did not change the levels of chlorophyll a or carotenoids, however the application of yeast reduced the chlorophyll b content in this cultivar. In the cultivar All Big, yeast and ASM reduced the severity of bacterial spot by 25% and 80%, respectively. The yeast suspension activated the PFO and POX enzymes at 1 and 6 days after its application, respectively (moments before inoculation and 3 days after). On the contrary, in this cultivar, spraying with ASM did not activate any of the evaluated defense enzymes. Regarding photosynthetic pigments, the ASM in All Big reduced the carotenoid content, and both the yeast suspension and the ASM reduced the chlorophyll a and b contents. The results show that the yeast *S. cerevisiae* and ASM have the potential to help manage the disease.

**Keywords:** leaf spot, alternative control, yeast, defense mechanisms, resistance induction, oxidative stress, photosynthetic pigments.

## 5.1 Introdução

O pimentão é uma das hortaliças mais consumidas no mundo. Estima-se que um quarto da população mundial utilize pimentões para a produção de condimentos e conservas devido a seu aroma, sabor, altos teores de vitamina A, capsaicinoides, fenóis, vitamina C, ácidos graxos e por sua diversificada coloração atribuída à presença de pigmentos como os carotenoides, que se caracterizam por apresentar atividade antioxidante e anticancerígena (TAITI, 2019; FRATIANNI et al., 2020). Já no Brasil, o pimentão (*Capsicum annuum* L.), é uma das hortaliças mais cultivadas, a qual está estabelecida em aproximadamente 13 mil hectares, proporcionando uma produção de 224 mil toneladas (IBGE, 2022).

As lavouras de pimentão podem ser afetadas por diferentes bacterioses, entre elas a mancha foliar causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (DREHKOPF; OTTEN e BÜTTNER, 2022). A doença da mancha foliar ocasiona perdas consideráveis, afetando a cultura em qualquer fase do seu desenvolvimento, provocando necrose foliar, abscisão prematura de folhas e, como consequência, detrimento da taxa fotossintética (AGUIAR et al., 2003; MORETTI et al., 2009; WORTHINGTON et al, 2012).

O controle da mancha bacteriana é baseado na implementação de cultivares resistentes e com produtos à base de cobre em combinação com antibióticos como o sulfato de estreptomicina. Não obstante, a resistência desta bactéria a estes produtos é um obstáculo no manejo da doença no mundo inteiro, já que além de aumentar os custos de produção, também causam um impacto negativo ao meio ambiente (UTAMI, MEALE e YOUNG, 2022; KEINATH, 2019; OSDAGHI et al., 2016; MCMANUS et al., 2002).

Pelo fato que no mundo e no Brasil já foram registradas ocorrências de *Xanthomonas* resistentes ao cobre (MARINGONI e KIMATI, 1987; AGUIAR et al., 2000; RITCHIE et al., 2009), métodos alternativos devem ser encontrados para controlar a mancha bacteriana do pimentão. Um destes métodos é a indução de resistência, que consiste na ativação dos mecanismos de defesa da planta.

De maneira natural, os mecanismos de defesa da planta são ativados quando seus receptores de transmembrana PRRs (do inglês: *pattern recognition receptors*) reconhecem padrões moleculares associados a microrganismos MAMPs (*microbe-*

*associated molecular pattern*) ou de patógenos PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), como a flagelina, os lipopolisacarídeos, e os peptidoglicanos de bactérias (RYAN et al., 2007; SCHWESSINGER e ZIPFEL, 2008; BOLLER e HE, 2009; HENRY; THONART; ONGENA, 2012). Analogamente, também os mecanismos de defesa da planta podem ser ativados de maneira artificial com indutores de resistência (IR).

Os IR são produtos que apresentam em sua composição moléculas elicitoras, as quais ao serem reconhecidas pelos PRRs ativam sistemicamente na planta mecanismos de defesa como a síntese de caloses, lignina, espécies reativas de oxigênio, enzimas antioxidantes, fitoalexinas, liberação de etileno, acúmulo de cálcio e ativação de genes e proteínas relacionadas à patogênese (SEGONZAC e ZIPFEL, 2011; CAVALCANTI, BRUNELLI e STANGARLIN, 2005). As moléculas elicitoras podem ser de procedência abiótica como como ácido salicílico, ou de origem biótica, como polissacarídeos provenientes de cogumelos, crustáceos, plantas ou leveduras (GUZZO; HARAKAVA e TSAI, 2009; FONTENELLE et al., 2011; HAHN, 1999; ANGELOVA; GEORGIEV e ROSS, 2006).

Um dos produtos capazes de ativar os mecanismos de defesa das plantas é o Bion®, produto comercial que tem o acibenzolar-S-Metil (ASM) como ingrediente ativo, e que não apresenta ação direta contra patógenos (SYNGENTA, 2021). Soylu, Baysal e Soylu (2003) encontraram que o ASM pulverizado em plantas de tomate reduziu a severidade do cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis*) em função do aumento da atividade de peroxidases nas plantas. Ao passo, Lima et al. (2017) relataram que a aplicação do ASM aumentou a atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase, e reduziu a severidade do cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) em plantas de uva. Também Doungous et al. (2021) relataram que o ASM atrasou o aparecimento dos sintomas do vírus do mosaico da mandioca (ACMV) e induziu resistência a seu vetor da mosca branca (*Bemisia tabaci*).

Analogamente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta potencial para reduzir a severidade de doenças causadas por *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* em sorgo, *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão e *Colletotrichum lagenarium* em pepino. O controle destes patógenos por parte da levedura foi atribuído à sua capacidade de sintetizar compostos antibióticos, e pela habilidade de competir contra patógenos por espaço e nutrientes no filoplano de

diferentes plantas. Adicionalmente, componentes essenciais de membranas e paredes celulares desta levedura como a glucana, o ergosterol e/ou quitina atuam como elicitores que ativam os mecanismos de defesa da planta (PICCININ; DI PIERO e PASCHOLATI, 2005; ZANARDO, PASCHOLATI e FIALHO, 2009). Uma das maneiras de obter componentes elicitores de *S. cerevisiae* é mediante o filtrado ou a precipitação etanólica de suspensões celulares desta levedura (WULFF, N. A.; PASCHOLATI, 1998).

Produtos de fácil aquisição como a levedura *S. cerevisiae*, e o ASM, atuando de modo distinto ao dos agroquímicos convencionais, se constituem em uma alternativa de manejo que poderia ser utilizada na cultura de pimentão para controlar a mancha bacteriana de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Dessa maneira, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do ASM e de suspensões celulares de *S. cerevisiae* na redução da severidade da mancha bacteriana (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*) do pimentão, e determinar a atividade das enzimas de defesa peroxidase (POX), catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO), fenilalanina amônia-liase (FAL) e o teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides de plantas de pimentão pulverizadas com suspensões celulares de *S. cerevisiae*, ou ASM e desafiadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Semeadura do pimentão**

Em casa de vegetação, sementes de pimentão das cultivares Rubi Gigante (Feltrin®) e All Big (Feltrin®), disponíveis nas casas agropecuárias da região de Florianópolis, foram semeadas em células preenchidas com substrato comercial Caroline®. Três semanas após a semeadura, foram plantadas duas plântulas por vaso de 5 litros contendo solo vermelho com turfa numa proporção 3:1. As plantas foram adubadas duas vezes durante cada experimento com N-P-K (10-10-10) 10 gL<sup>-1</sup>, colocando 10 mL por vaso.

### 5.2.2 Preparo da suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Para o isolamento de *S. cerevisiae*, uma suspensão do fermento comercial Fleischmann (15 mg mL<sup>-1</sup> em água destilada estéril), foi diluída em serie até 10<sup>-5</sup> e 50 µL da última diluição foram repicados em placas de petri contendo meio BDA. Após 5 dias de incubação sob luz fluorescente constante a 27 °C, as colônias da levedura foram transferidas para outras placas de petri contendo meio BDA. Após 5 dias de incubação, as células de levedura foram suspensas em água destilada estéril e a suspensão foi ajustada para 8 x 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> em câmara de Neubauer.

### 5.2.3 Preparo e calibração do inóculo bacteriano

Para a calibração do inóculo o isolado 112-P de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* fornecido pela Embrapa Hortaliças e conservado em tampão fosfato foi repicado em placas de petri contendo meio Nutriente Ágar (28 g.L<sup>-1</sup>) e mantidas a 25 °C por 48 horas. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana (0,6 U.A. a 600 nm) em leitor de microplacas (Molecular Devices Beckman Paradigm Multi-Mode Microplate Reader), que equivale aproximadamente a 1 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) mL<sup>-1</sup>.

### 5.2.4 Efeito da aplicação de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão

Em casa de vegetação e em diferentes momentos foram conduzidos três experimentos iguais para determinar o efeito de *S. cerevisiae* no controle da mancha bacteriana. No primeiro e segundo experimentos foi utilizada a cv. Rubi Gigante e no terceiro a cv. All Big a qual apresenta maior suscetibilidade à mancha bacteriana. Em todos os experimentos as plantas foram pulverizadas no estágio de sete folhas, com uma suspensão celular de *S. cerevisiae* a 8 x 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> e 3 dias depois inoculadas na superfície adaxial e abaxial das folhas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (0,6 U.A. a 600 nm) com pulverizador elétrico (Vonder PEV400 400W®). Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas para facilitar a abertura dos estômatos e garantir a infecção e colonização da bactéria. Passados 14 dias da inoculação, a cada 7 dias e por um período de 28 dias foram

avaliados visualmente a severidade dos sintomas causados pela bactéria (porcentagem de área de folha afetada) da terceira e quarta folha de abaixo para acima. Como controle negativo, as plantas foram borrifadas com água destilada ou como controle positivo com o indutor ASM a 50 ppm do ingrediente ativo.

### **5.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes e de defesa**

Para analisar a atividade de enzimas, plantas de pimentão cv Rubi Gigante ou All Big foram pulverizadas com suspensão celular de *S. cerevisiae* a  $8 \times 10^7$  células/mL, água destilada, ou com o indutor ASM a 50 ppm e inoculadas 3 dias depois com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). Foram coletadas a terceira e quarta folhas (de baixo para acima) nos tempos 0, 24, 72 e 96 horas após à inoculação (HAI). As folhas foram dispostas em envelope de papel alumínio, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas no ultra freezer a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento do processamento.

Para a extração de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo: guaiacol de peroxidase (POX), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PFO), 250 mg de folhas foram maceradas sob nitrogênio líquido. Ao pó resultante foram adicionados 5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 5,2, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM. A suspensão foi colocada em microtubos e centrifugadas a  $14000 \text{ g}$  a  $4^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para outros microtubos e foi considerado como o extrato proteico para as análises enzimáticas. Já para avaliar a atividade da enzima de defesa fenilalanina amônia-liase (FAL), as amostras vegetais foram coletadas e processadas da mesma maneira, mas utilizando tetraborato de potássio 50 mM, pH 8,8 como tampão de extração.

### **5.2.6 Atividade de peroxidase de guaiacol – POX**

A atividade de POX foi determinada pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A reação enzimática foi conduzida a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e a mistura da reação consistiu de  $35 \text{ }\mu\text{L}$  de extrato enzimático adicionados em  $135 \text{ }\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 5,2, contendo peróxido de hidrogênio (1%), e guaiacol (2%). A mudança

da absorvância foi medida a cada 30 segundos a 420 nm por 3 min em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader). A atividade de POX foi expressa em U de POX.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>, onde 1 unidade de POX foi considerada a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01 unidades de absorvância.

### **5.2.7 Atividade de catalase CAT**

A atividade de CAT foi determinada segundo a metodologia de Peixoto et al. (1999), com adaptações. Para isso, 35 µL de extrato enzimático foram adicionados a 135 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 5,2, contendo peróxido de hidrogênio 50 mM. Em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader), a 30 °C e a cada 30 segundos e por 3 minutos foi medida a variação da absorção do peróxido de hidrogênio a 240 nm. A atividade específica de CAT foi expressa em U de CAT.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>, sendo 1 unidade de CAT considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorvância.

### **5.2.8 Atividade de polifenoloxidase – PFO**

A atividade de PFO foi determinada mediante a quantificação da oxidação de catecol segundo a metodologia de Duangmal e Apenten (1999) com adaptações. O substrato da reação consistiu de tampão fosfato 50 mM, pH 5,2, contendo catecol 20 mM. A reação foi conduzida a 30°C, adicionando-se 35 µL de extrato enzimático em 135 µL de tampão de reação, as leituras foram realizadas a cada 30 segundos por 3 minutos a 420 nm em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader). A atividade específica de PFO foi expressa em U de PFO.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>, sendo 1 unidade de PFO considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorvância.

### **5.2.9 Atividade fenilalanina amônia-liase – FAL**

A atividade de FAL foi determinada segundo a metodologia de Falcon (2008); com adaptações. O substrato da reação consistiu de tampão tetraborato de potássio 50 mM, pH 8,8, contendo L-fenil-alanina 50Mm. A reação iniciou pela incubação a 40 °C

por uma hora de 50 µL de extrato enzimático em 450 µL do substrato da reação. Após a incubação, as amostras foram submetidas a banho de gelo para interromper a reação e posteriormente foram adicionados 200 µL de HCL 5N e 300 µL de água destilada. Para o branco foi adicionado tampão tetraborato de potássio 50 mM, pH 8,8 em vez de extrato enzimático. Finalmente foi realizada a leitura a 290 nm em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader) e os dados foram expressos em mg de ácido transcinâmico .mg de proteína<sup>-1</sup>.

### 5.2.10 Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método Bradford (1976). Para isto 60 µL de extrato enzimático foram adicionados a 30 µL do reagente Bradford (Sigma ®) e incubados por 15 minutos no escuro. Após da incubação foi realizada a leitura a 595 nm em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader). Como branco foi utilizado água destilada mais Bradford. A concentração de proteínas totais foi calculada mediante a curva padrão de padrão de albumina de soro bovino  $y = 0,0037x + 0,2363$ .

### 5.2.11 Teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides de plantas de pimentão tratadas com *Saccharomyces cerevisiae* e ASM e inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

Para a quantificação dos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides de plantas de pimentão foi utilizada a metodologia de Arnon (1949) com adaptações. Para isso, discos foliares de 5 mm foram retirados 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondentes ao dia da inoculação e 96 horas após à inoculação, respectivamente. As amostras de tecido vegetal foram pesadas e acondicionadas em frascos de vidro âmbar contendo 5 mL de acetona 80%, durante sete dias no escuro a 25°C. Ao fim do período, realizou-se leitura em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader) a 663, 645 e 480 nm para clorofila *a*, *b* e carotenoides respectivamente. A determinação do teor de clorofila *a* foi calculada pela fórmula  $(0,0127 * A_{663}) - (0,00269 * A_{645})$  e de clorofila *b* pela fórmula  $(0,0229 * A_{645}) - (0,00468 * A_{663})$ . Já o teor de carotenoides foi determinado pela formula  $[(1000 * A_{480})$

-  $((2,14 \cdot \text{clorofila } a) - (70,16 \cdot \text{clorofila } b))/220$ . Os valores foram expressos em mg. g<sup>-1</sup> tecido fresco.

### 5.2.12 Delineamento experimental e análise de dados

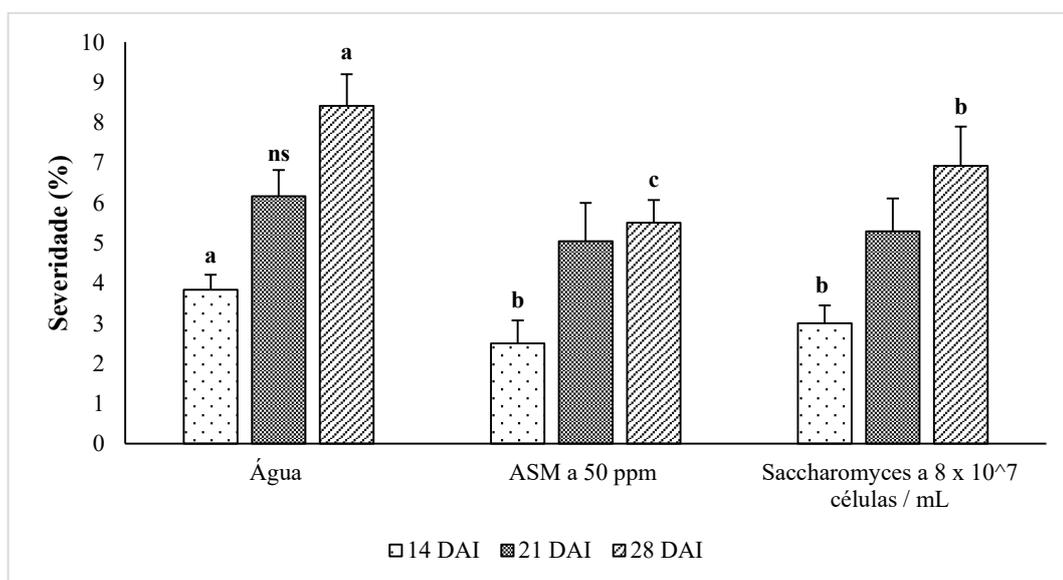
Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e com um delineamento inteiramente casualizado, onde a unidade experimental esteve representada por um vaso contendo duas plantas de pimentão. Para as análises de severidade da doença foram utilizadas 6 repetições por tratamento. Ao passo, as análises de atividade enzimática e de pigmentos fotossintéticos foi realizada com 4 repetições por tratamento. Os dados adquiridos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando significativo as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). O pressuposto da homogeneidade das variâncias foi analisado pelo teste Levene. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de análise estatística SISVAR 5.6.

## 5.3 Resultados

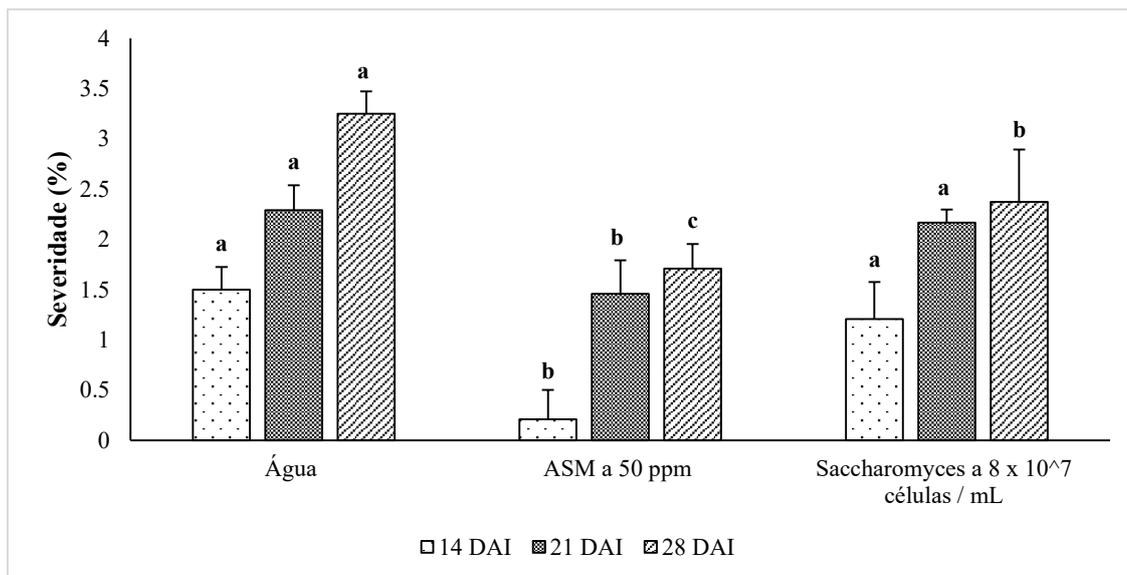
### 5.3.1 Efeito da aplicação de *Saccharomyces cerevisiae* e ASM sobre a severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão cv. Rubi Gigante e cv. All Big

Inicialmente, em plantas de pimentão cv. Rubi Gigante pulverizadas com a levedura, observou-se uma redução significativa na severidade da mancha bacteriana em torno de 20% e 15% aos 14 e 28 dias após a inoculação (DAI), respectivamente, no primeiro experimento (Figura 14) e em aproximadamente 30% aos 28 DAI no segundo experimento (Figura 15). Por sua vez, o ASM mostrou-se efetivo no controle da doença, reduzindo-a aos 14 DAI e 28 DAI em aproximadamente 40% e 15% respectivamente no primeiro experimento com a cultivar Rubi Gigante (Figura 14). Já no segundo experimento, o ASM foi eficiente em reduzir os sintomas da doença aos 14 DAI, 21 DAI e 28 DAI, em aproximadamente 80%, 35% e 45% respectivamente (Figura 15).

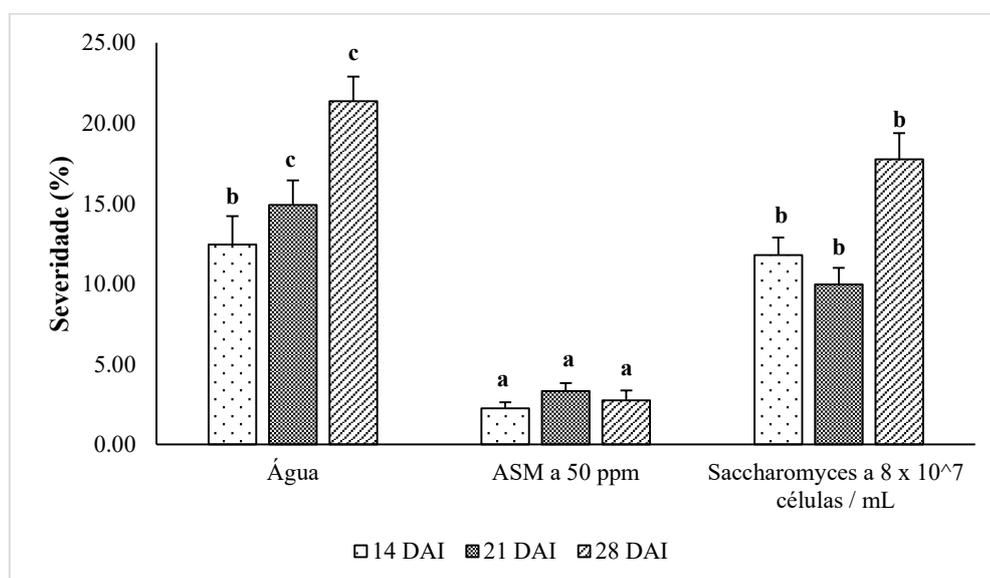
De modo similar à cultivar Rubi Gigante, as plantas do cultivar All Big apresentaram redução significativa na severidade da doença quando pulverizadas com o ASM ou com a suspensão da levedura. Com a levedura foi observada uma redução da severidade da mancha bacteriana aos 21 DAI e 28 DAI, em aproximadamente 35% e 20% respectivamente. Ao passo, com o ASM foi observada uma redução da doença aos 14 DAI, 21 DAI e 28 DAI de aproximadamente 80%, 75% e 85% respectivamente (Figura 16).



**Figura 14.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão cv. Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



**Figura 15.** Severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância.



**Figura 16.** Severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. (Dados dos 14 e 21 DAI foram transformados mediante raiz quadrada).

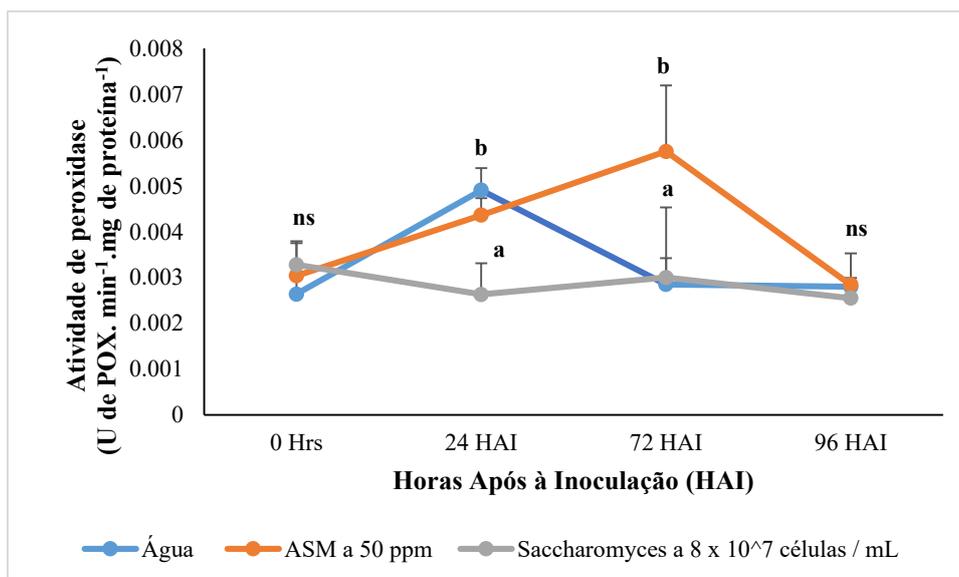
### **5.3.2 Atividade enzimática**

#### **5.3.2.1 Cultivar Rubi Gigante**

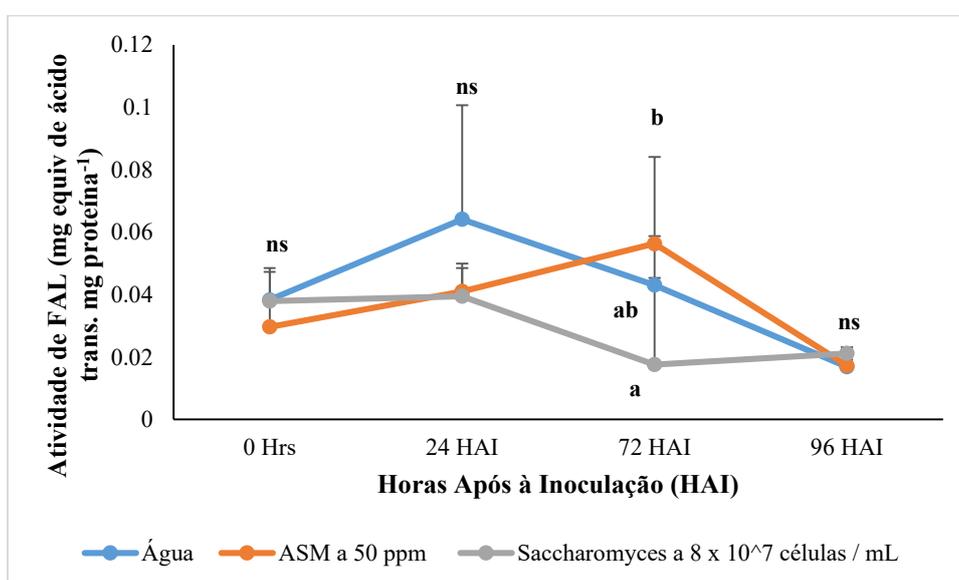
Os resultados desta pesquisa evidenciaram que nas plantas da cultivar Rubi Gigante o indutor ASM aumentou a atividade de POX no tempo 72 HAI, com posterior decréscimo. Já as plantas tratadas com a levedura apresentaram atividade de POX constante ao longo de todo o experimento (Figura 17). Na mesma cultivar, o ASM aumentou nas plantas a atividade da enzima FAL até 72 HAI, e esta atividade foi significativamente superior à registrada nas plantas pulverizadas com a levedura, mas não ao observado nas plantas controle para este mesmo período (Figura 18).

Também foi observado que ASM nas plantas do cultivar Rubi Gigante promoveu a redução na atividade de CAT 96 HAI. Nos outros tempos, a atividade não diferiu da testemunha. A levedura promoveu aumento na atividade de CAT aos 3 dias após sua aplicação nas plantas, logo antes da inoculação, mas essa atividade foi reduzida nos tempos posteriores, não diferindo dos demais tratamentos (Figura 19).

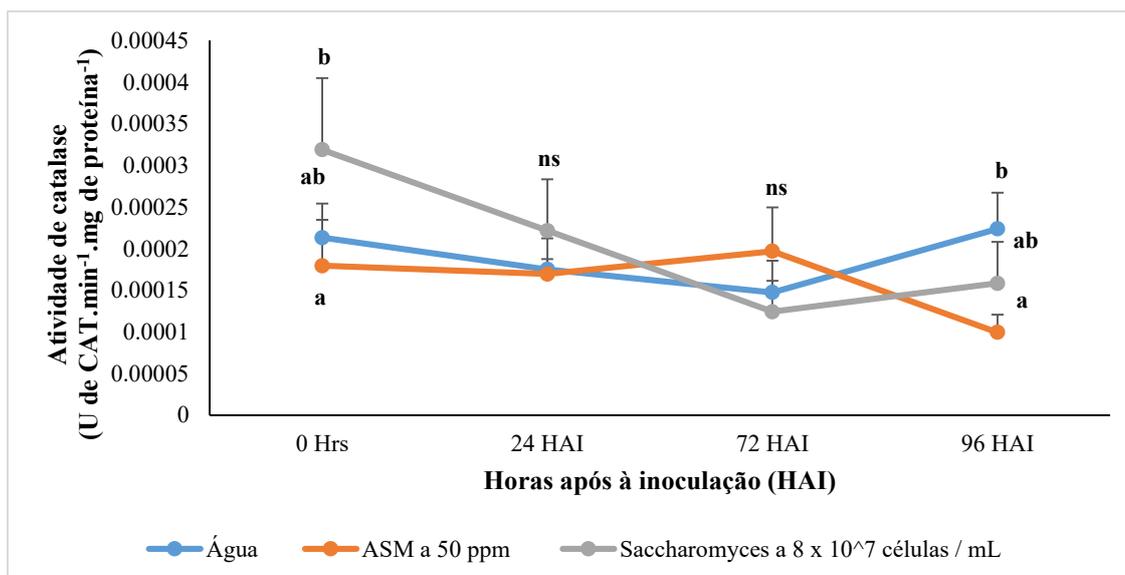
Finalmente, no cultivar Rubi Gigante foi observado que ASM promoveu nas plantas o aumento na atividade de PFO até 72 HAI, e que esta atividade posteriormente diminuiu às 96 HAI (Figura 20), como similarmente ocorreu para a atividade de POX, FAL e CAT deste mesmo grupo de plantas (Figura 17, 18 e 19). No entanto, foi observado que apenas às 24 HAI as plantas tratadas com este produto apresentaram atividade de PFO significativamente superior quando comparado com as plantas tratadas com a levedura e com as plantas controle, as quais não diferiram significativamente entre si. Já a aplicação da levedura não promoveu alterações na atividade da PFO ao longo de todo o tempo experimental (Figura 20).



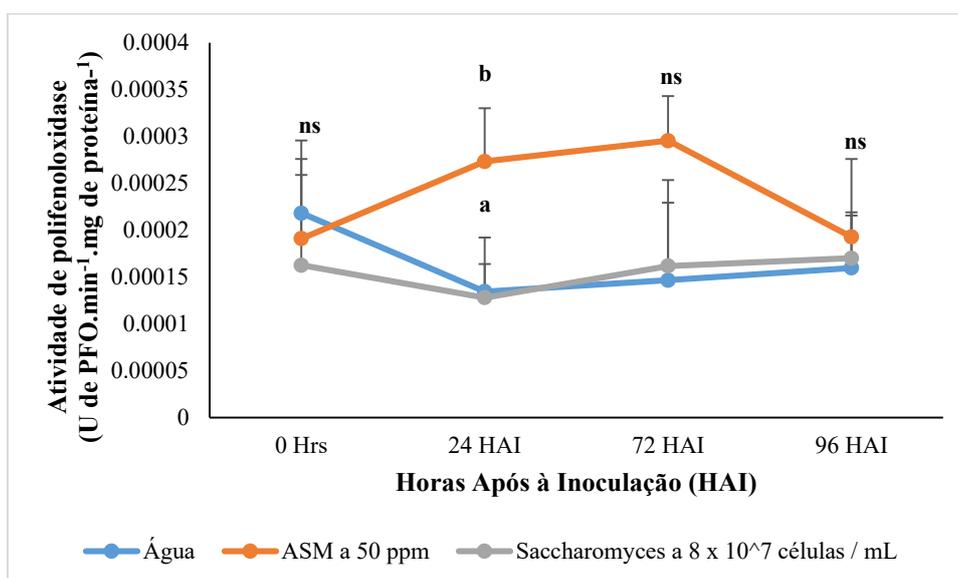
**Figura 17.** Atividade de peroxidase (POX) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



**Figura 18.** Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



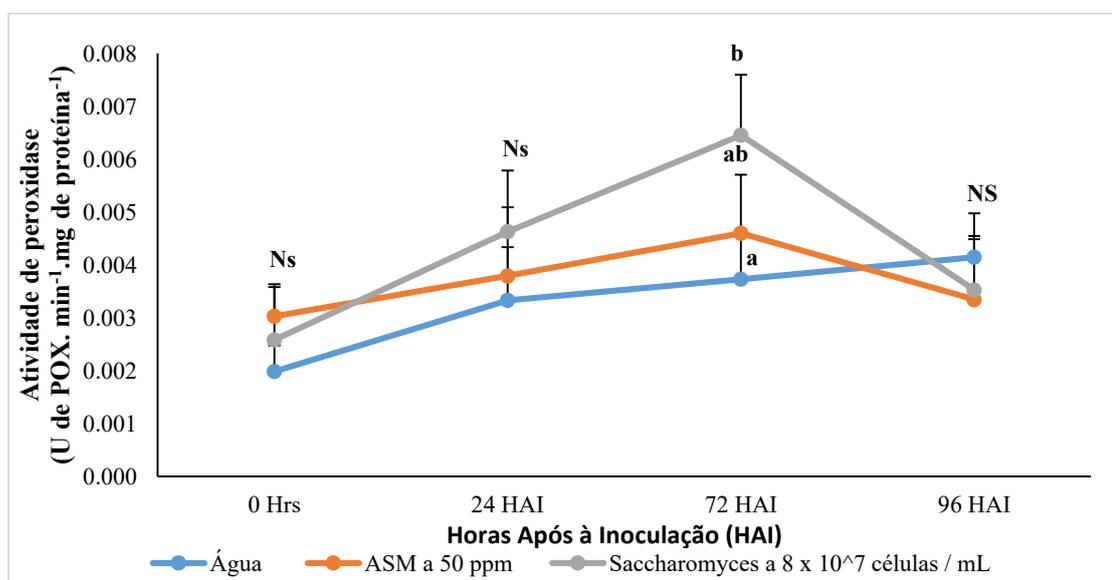
**Figura 19.** Atividade de catalase (CAT) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



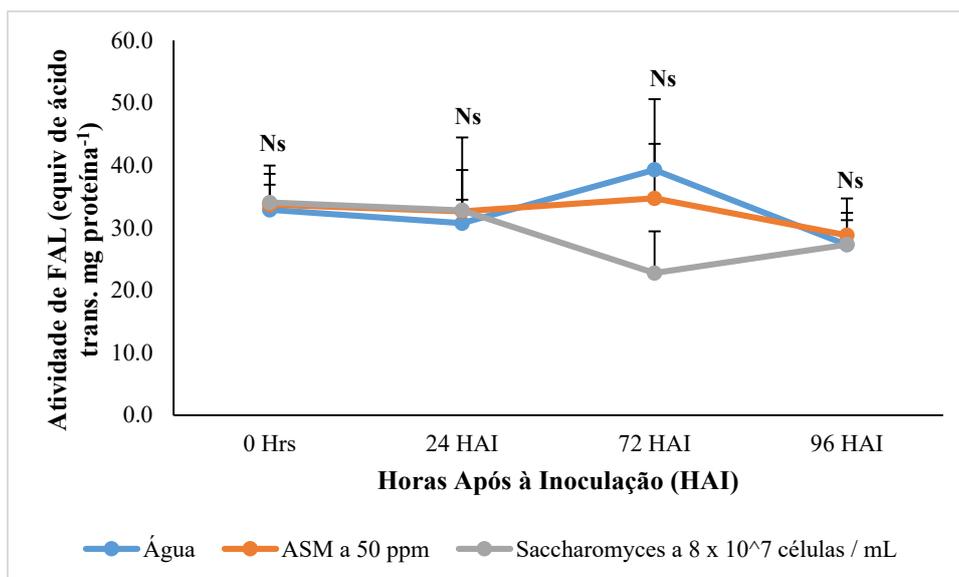
**Figura 20.** Atividade de polifenoloxidase (PFO) em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.

### 5.3.2.2 Cultivar All Big

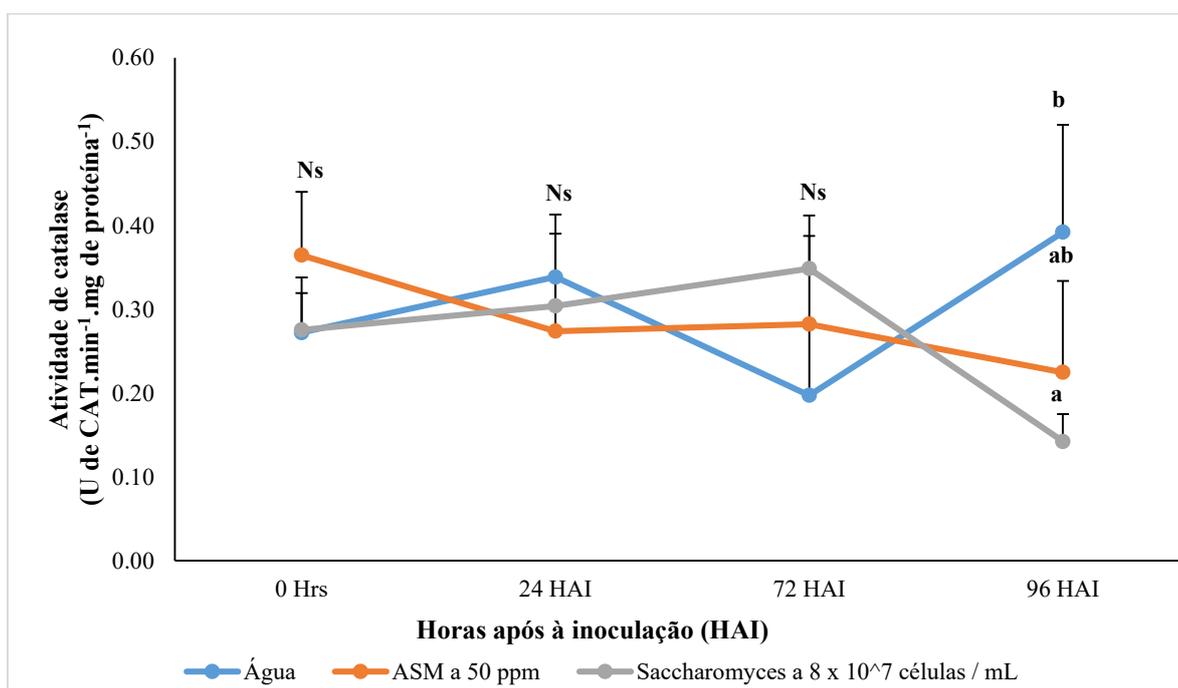
Com relação à cultivar All Big, o ASM não ativou significativamente as enzimas POX, FAL, CAT e PPO ao longo do tempo de estudo (Figuras 21, 22, 23 e 24). Por outro lado, foi observado que a suspensão de levedura nas plantas da cultivar All Big ativou significativamente POX às 72 HAI com posterior decréscimo (Figura 21). De modo similar, a suspensão promoveu aumento na atividade da PFO 3 dias após a sua aplicação, logo antes da inoculação, mas essa atividade foi reduzida até às 96 HAI quando foi significativamente inferior ao controle (Figura 24). Não houve efeito da levedura na atividade da FAL ao longo do tempo (Figura 22), enquanto a atividade de CAT foi significativamente reduzida às 96 HAI nas plantas tratadas (Figura 23).



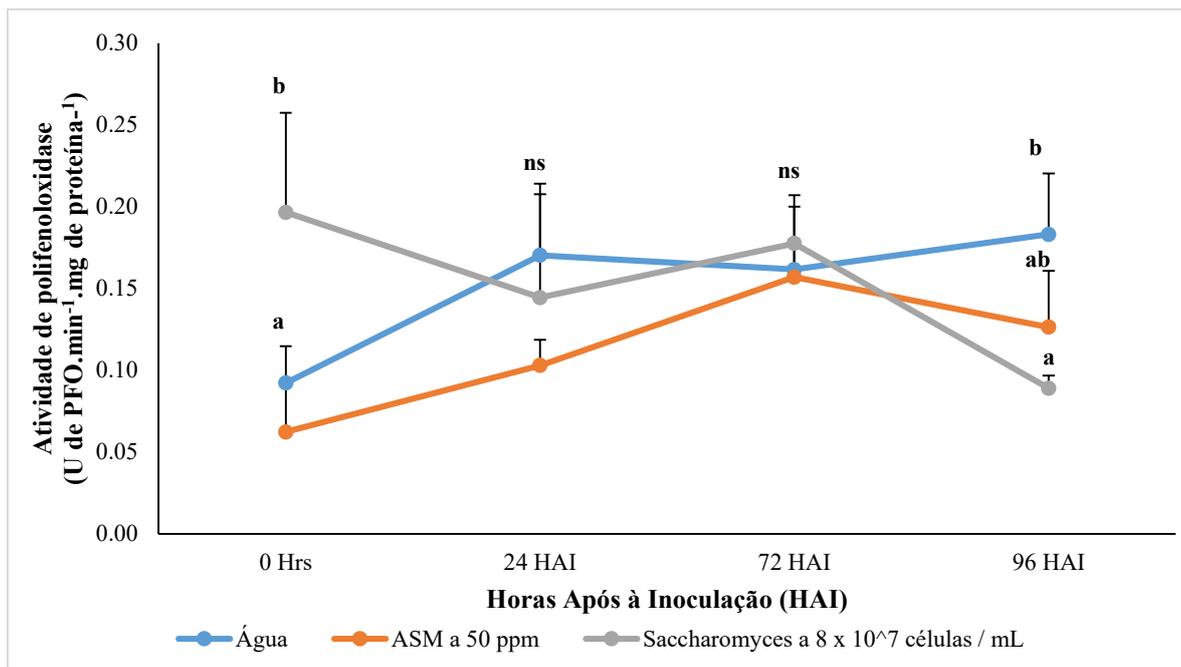
**Figura 21.** Atividade de peroxidase (POX) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



**Figura 22.** Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



**Figura 23.** Atividade de catalase (CAT) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.

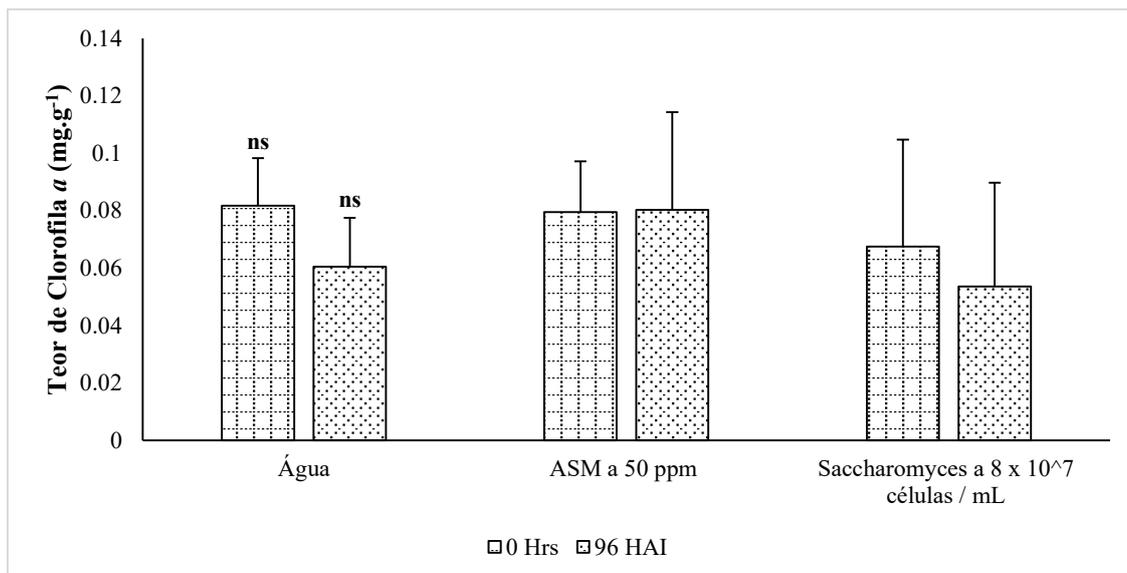


**Figura 24.** Atividade de polifenoloxidase (PFO) em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas antes da inoculação (0Hrs) e 24, 72 e 96 horas após a inoculação (HAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. (Dados dos 24 HAI foram transformados mediante raiz quadrada).

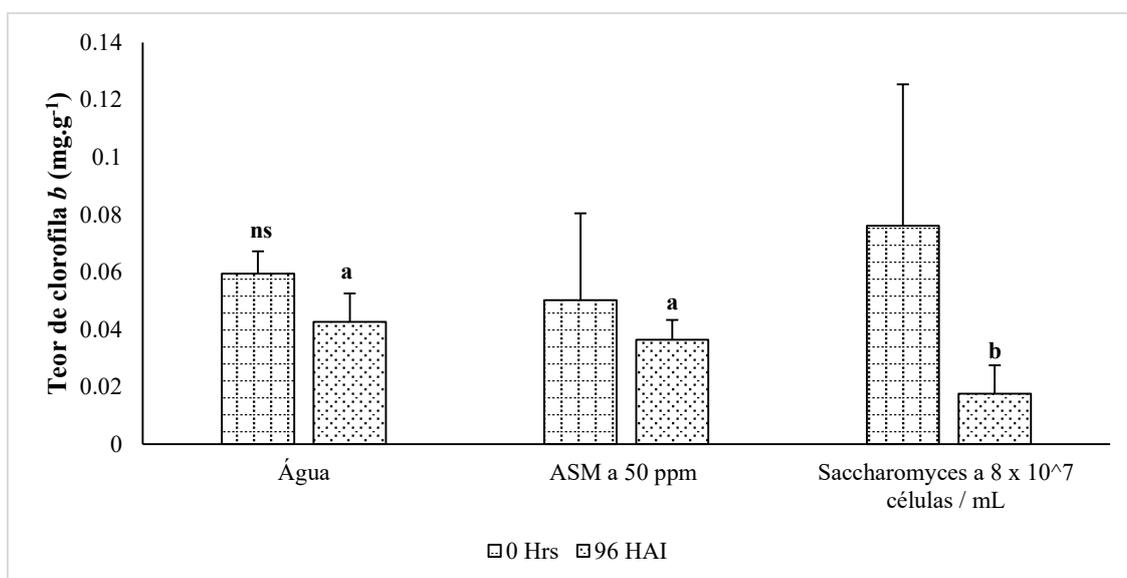
### 5.3.3 Teor de clorofila a, b e carotenoides

#### 5.3.3.1 Cultivar Rubi Gigante

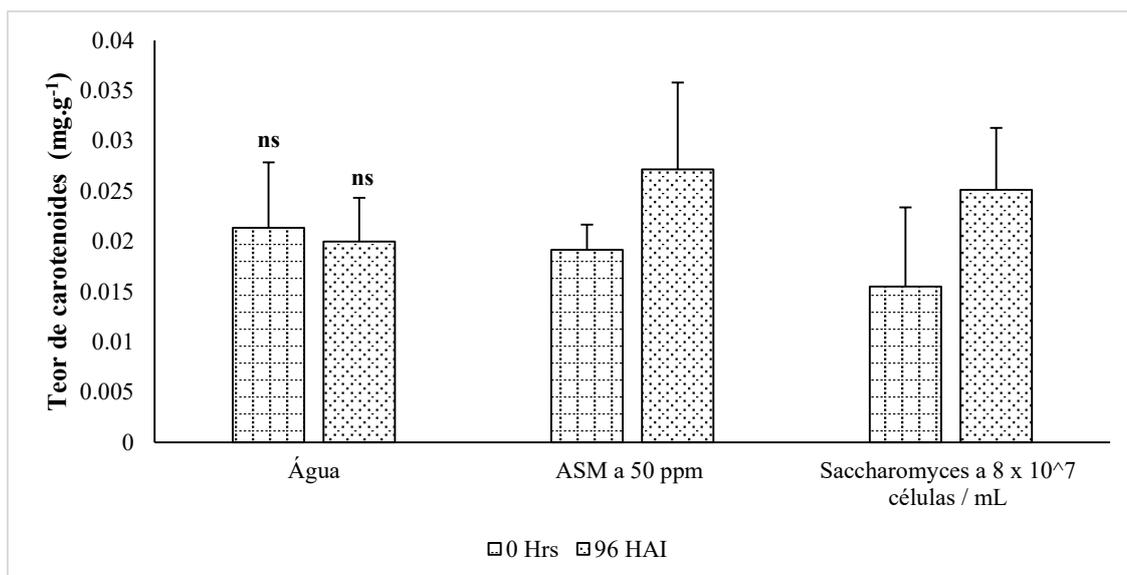
Em relação ao teor de clorofila a e de carotenoides de plantas de pimentão Rubi Gigante, foi observado que nem a levedura nem o ASM influenciaram neste cultivar para promover o acúmulo destes pigmentos fotossintéticos nos tempos avaliados (Figura 25 e 27). Por outra parte foi observado que a pulverização com a levedura afetou negativamente o teor de clorofila b aos 7 dias após a aplicação (correspondente a 96 HAI), já que para este momento estas plantas apresentaram um teor deste pigmento significativamente inferior ao observado nas plantas pulverizadas com ASM ou com água, os quais a sua vez não diferiram significativamente entre si (Figura 26).



**Figura 25.** Conteúdo de clorofila *a* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%.



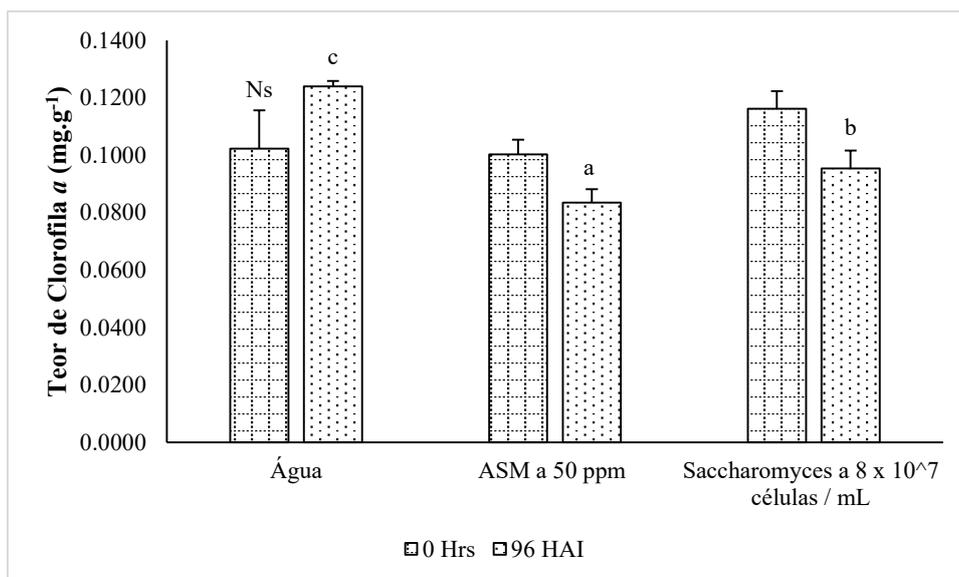
**Figura 26.** Conteúdo de clorofila *b* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



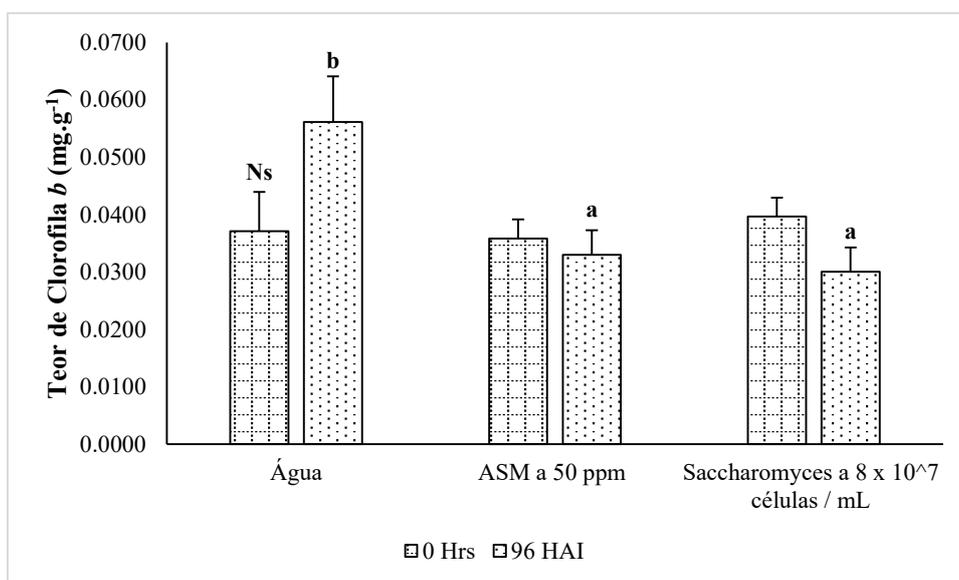
**Figura 27.** Conteúdo de carotenoides em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600 \text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%.

### 5.3.3.2 Cultivar All Big

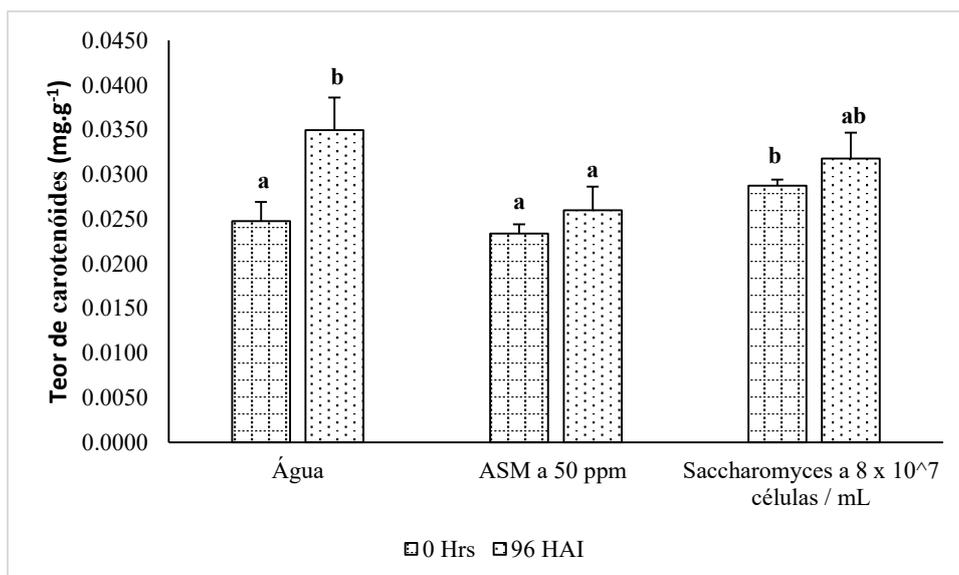
Nas plantas do cultivar All Big foi observado que tanto a levedura como o ASM reduziram o teor de clorofila *a* e *b* (Figura 28 e 29). Contudo, foi observado que a suspensão de levedura aumentou o teor de carotenoides 3 dias após a sua aplicação, correspondente ao momento antes da inoculação e que o ASM o reduziu (Figura 30).



**Figura 28.** Conteúdo de clorofila *a* em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%.



**Figura 29.** Conteúdo de clorofila *b* em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo.



**Figura 30.** Conteúdo de carotenoides em plantas de pimentão All Big pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm ou suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* ( $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). As avaliações foram realizadas 3 e 7 dias após a aplicação dos produtos, correspondente ao dia da inoculação e 96 horas após a inoculação, respectivamente. Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%.

#### 5.4 Discussão

A ativação dos mecanismos de defesa de plantas mediante o uso de indutores de resistência é uma estratégia alternativa que ajuda no controle de doenças. Nesta pesquisa para reduzir a severidade da mancha bacteriana do pimentão, foram testadas suspensões celulares da levedura *S. cerevisiae* e o agrotóxico Bion, à base de ASM, um ativador de mecanismos de defesa de plantas que reduz os sintomas de diferentes doenças.

Inicialmente, foi observado que o ASM pulverizado 3 dias antes da inoculação (DAi) reduziu a severidade da mancha bacteriana em aproximadamente 50% em Rubi Gigante (Figuras 14 e 15) e em aproximadamente 80% no cultivar All Big (Figura 16). Presume-se que o ASM, um análogo do ácido salicílico, agiu nas plantas de ambos cultivares de pimentão como uma molécula sinalizadora, induzindo à expressão de genes e síntese de enzimas de defesa de plantas relacionadas à rota do ácido salicílico, a qual está envolvida principalmente contra o ataque de patógenos biotróficos ou hemibiotróficos (SÁNCHEZ et al., 2010) como é o caso da *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

Os resultados do presente estudo parecem indicar que o ASM reduziu a severidade dos sintomas da doença no cultivar Rubi Gigante (Figura 14 e 15) em função da ativação das enzimas antioxidantes que atuam na via do ácido salicílico POX e PFO (Figura 17 e 20), mas não de FAL e CAT (Figura 18 e 19). Em All Big, ao contrário, o indutor comercial não promoveu alterações significativas nas enzimas estudadas (Figuras 21, 22, 23 e 24), de maneira que a redução na severidade da bacteriose observada nessa cultivar (Figura 16) poderia envolver mecanismos de defesa diferentes dos aqui avaliados, já que o produto não apresenta atividade antimicrobiana. Considerando-se que *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* é um patógeno hemibiotrófico, torna-se importante realizar experimentos onde se avalie a indução de enzimas como a lipoxigenase, que age contra patógenos necrotróficos e atua na via do ácido jasmônico.

Uma das respostas iniciais de plantas à infecção bacteriana é o acúmulo de  $H_2O_2$  no interior de suas células. Os danos provocados por esta espécie reativa de oxigênio podem ter sido amenizados na cultivar Rubi Gigante mediante a ativação da enzima POX e PFO nas plantas pulverizadas com o ASM (Figuras 17 e 20), prevenindo assim a morte celular antecipada, e isto, se viu refletido na redução da severidade da doença (Figura 14 e 15). Por outro lado, se presume que o aumento na atividade de POX registrado às 72 HAI nas plantas Rubi Gigante tratadas com ASM (Figura 17), pode ter atrasado a colonização da bactéria, já que esta enzima está envolvida na síntese de lignina (TOBIMATSU e SCHUETZ, 2019), e provavelmente ajudou a fortalecer as paredes celulares das plantas, contribuindo no controle da doença.

Resultados similares foram reportados por Romero; Kousik e Ritchie (2001) que encontraram que a pulverização de ASM em diferentes cultivares de pimentão reduziu até por duas semanas a severidade de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; ou como Baysal, Turgut e Mao (2005) que comprovaram que este produto reduziu a severidade da requeima de *Phytophthora capsici* do pimentão em até um 45%. Outros autores como Buonauro et al. (2002) encontraram que a aplicação de ASM em plantas de pimentão reduziu de maneira local e sistêmica a severidade dos sintomas provocados por *X. campestris* pv. *vesicatoria* e relacionaram estes resultados com ativação da Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) da planta por parte do produto.

É importante destacar que aumentos nos níveis de POX de plantas também podem acontecer pela alteração da integridade celular induzida por lesões durante a infecção

patogênica e estágios necróticos de desenvolvimento da doença (ARORA e BAJAJ, 1985; REUVENI e BOTHMA, 1985). Por exemplo, ativação da enzima POX foi encontrada por Bashan, Okon e Henis (1987) em plantas suscetíveis e resistentes de tomate após à inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. tomate.

Com relação à enzima FAL, não foi encontrada evidência de sua participação na redução da severidade promovida pelo ASM nem tão pouco pela levedura em ambas as cultivares (Figura 18 e 22). Contudo, Baysal; Turgut e Mao (2005) mostraram que ASM reduziu a severidade de *Phytophthora capsici* em pimentão após a indução das enzimas quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases e FAL. Não obstante o aumento na atividade de FAL também tem sido observado em diferentes plantas após infecção com diferentes patógenos, já que a atividade desta enzima se relaciona com a síntese de compostos antimicrobianos como fenóis e fitoalexinas (HYUN et al., 2011).

Apesar de pesquisas como a de De Lima et al (2020) terem evidenciado o potencial do ASM para aumentar a taxa fotossintética e condutância estomática de plantas de tomate, em nossa pesquisa foi observado que o ASM nas plantas Rubi Gigante não afetou o teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides (Figura 25, 26 e 27). Em contrapartida, no outro experimento com a cultivar All Big, foi observado que o ASM reduziu o teor de clorofila *a*, *b* e de carotenoides (Figura 28, 29 e 30). A redução destes pigmentos na cv. All Big pela aplicação de ASM pode ser atribuída a um custo metabólico que a planta realizou numa tentativa de sintetizar algum composto de defesa, como também pode ser atribuída à agressividade da bactéria neste cultivar, a qual ao causar maior necroses nas folhas compromete em maior grau a síntese destes pigmentos.

Os resultados obtidos podem relacionar-se com os de Csinos et al (2001) que observaram que ASM reduziu o crescimento de plantas de tomate inoculadas com o vírus TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) ou com os de Godard et al (1999) que analisaram que o ASM reduziu o crescimento de plantas de couve-flor inoculadas como *Peronospora parasítica*. Já Cabral et al. (2010) observaram que ASM reduziu o crescimento da parte aérea de plantas de melão inoculadas com *Acidovorax citrulli*.

Esses resultados indicam que a redução da severidade da doença com o ASM em ambas as cultivares não esteve relacionada com o acúmulo de clorofila *a*, *b* e carotenoides. A redução no teor desses pigmentos na cv. All Big pode ter ocorrido em função de um custo metabólico associado à ativação de mecanismos de defesa

promovida pelo ASM. Estima-se que este custo metabólico numa cultura comercial poderia afetar negativamente os rendimentos da cultura.

Dado o potencial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para promover o crescimento e controlar doenças de plantas (DA CUNHA et al., 2018; HOFFMAN et al., 2012; YOUSSEF e SOLIMAN, 1997), nesta pesquisa também se avaliou uma suspensão celular da levedura *S. cerevisiae* obtida do fermento comercial Fleischmann ® na redução da severidade da mancha bacteriana do pimentão (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*). Em menor proporção comparada ao ASM, a suspensão celular de *S. cerevisiae* reduziu a severidade da mancha bacteriana do pimentão no cultivar Rubi Gigante (Figura 14 e 15) e no cultivar All Big (Figura 16). A aplicação de *S. cerevisiae* promoveu a ativação de algumas enzimas relacionadas à defesa em ambas as cultivares provavelmente após o reconhecimento pela planta de algum elicitor presente na parede celular da levedura como a glucana, a quitina, ou a manana.

A rápida ativação da enzima CAT observada nas plantas Rubi Gigante e de PPO nas plantas All Big tratadas com a levedura (Figura 19 e 24), possivelmente ajudou a amenizar os danos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado nas plantas durante as primeiras horas da infecção bacteriana. Por outro lado, apesar de não terem sido realizados experimentos in vitro, se estima que o nível de controle alcançado por esta suspensão nas cultivares também poderia estar relacionado a um efeito direto da levedura sobre a bactéria, mediante mecanismos como a competição ou a antibiose.

Resultados similares aos da pesquisa foram encontrados por Hoffman et al. (2012) que evidenciaram que extrato de *S. cerevisiae* em feijão aumentou a produtividade e reduziu a severidade do cretamento bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis*. Esses autores relacionaram a redução desta doença com componentes da levedura como quitina, oligômeros de N-acetilglucosamina, beta-glucanas, glicopeptídeos e ergosterol que possivelmente atuaram como elicitores, ativando mecanismos de defesa da planta. Ao passo, Shimada et al. (1993) afirmam que *S. cerevisiae* controla diferentes doenças de plantas e é promissora para o crescimento vegetal, devido ao seu conteúdo de citocinina que desempenha um papel benéfico na divisão e aumento das células das plantas.

Por outro lado, com a cultivar All Big foi observado que a levedura afetou negativamente o teor de clorofila *a*, e tanto neste cultivar como no cultivar Rubi

Gigante afetou negativamente o teor de clorofila *b*, quando comparado aos controles. A redução de estes pigmentos fotossintéticos pode ter acontecido pela formação de um biofilme nas superfícies das folhas que possivelmente saturaram os estômatos, dificultando assim a troca gasosa, a fotossíntese e o acúmulo destes pigmentos.

Embora apresentando menor atividade biológica comparada ao ASM, esta levedura poderia ser indicada para controlar a mancha bacteriana do pimentão, já que é um produto natural, que ao ser aplicado no cultivo do pimentão reduziria a severidade desta doença a um baixo custo econômico e sem causar um impacto negativo ao meio ambiente e à saúde humana, diferente do cobre e os antibióticos, ou até do mesmo ASM, produtos provenientes de sínteses química que podem ocasionar um impacto negativo.

## **5.5 Conclusões**

Desta pesquisa conclui-se que as suspensões celulares de *S. cerevisiae* apresentam potencial para serem utilizadas no manejo da mancha bacteriana do pimentão. O uso de ASM junto com um organismo de biocontrole como *S. cerevisiae* poderiam fornecer ao agricultor uma estratégia alternativa para controlar esta enfermidade.

## Referências

- AGRIOS, George N. **Plant pathology**. Elsevier, 2005.
- AGROFIT. Disponível em [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 10 de Jan2022.
- AGUIAR, L. A. D., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. D. L. D., AKIBA, F., & CARMO, M. G. F. D. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria em pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 44-50, 2003.
- AGUIAR, L., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. L. D., AKIBA, F., & CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria de pimentão e tomateiro. **Agronomia**, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2000.
- AIRAKI, M. Función de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L) durante el desarrollo y en estrés por baja temperatura. Granada: **Universidad de Granada**, 2012.
- ANGELOVA, Z.; GEORGIEV, S.; ROOS, W. Elicitation of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 20, n. 2, p. 72-83, 2006.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI. **Brazilian Horti & Fruti Yearbook**. Santa Cruz do Sul, Editora Gazeta, p 96p, 2019.
- ARNON, D. I., & WHATLEY, F. R. Is chloride a coenzyme of photosynthesis? **Science**, v. 110, n. 2865, p. 554-556, 1949.
- ARORA, Y. K.; BAJAJ, K. L. Peroxidase and Polyphenol oxidase associated with, induced resistance of Mung bean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Journal of Phytopathology**, v. 114, n. 4, p. 325-331, 1985.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Peroxidase, polyphenoloxidase, and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in tomato plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n. 2, p. 366-372, 1987.
- BAYSAL, O.; TURGUT, C.; MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia plantarum**, v. 49, n. 4, p. 599-604, 2005.

BIRCH, P. R., ARMSTRONG, M., BOS, J., BOEVINK, P., GILROY, E. M., TAYLOR, R. M., ... & KAMOUN, S. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 4, p. 1133-1140, 2009.

BOLLER, T., & HE, S. Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 742-744, 2009.

BOLLER, T., & FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 379-406, 2009.

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

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUONAURIO, R., SCARPONI, L., FERRARA, M., SIDOTI, P., & BERTONA, A. Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 1, p. 41-49, 2002.

CABRAL, C. D. P., GAMA, M. A. S. D., ALEXANDRE, E. R., MARIANO, R. D. L. R., & SILVEIRA, E. B. D. Efeito de acibenzolar-S-metil, mananoligossacarídeo e bioflavonóides cítricos no controle da mancha-aquosa e no crescimento do meloeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 119-123, 2010.

CAMPOS, Â. D., FERREIRA, A. G., HAMPE, M. M. V., ANTUNES, I. F., BRANÇÃO, N., SILVEIRA, E. P. D., ... & AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, v. 81, n. 124, 2005.

CONSTABEL, C. P., BERGEY, D. R., & RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense

signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 2, p. 407-411, 1995.

CSINOS, A. S., PAPPU, H. R., MCPHERSON, R. M., & STEPHENSON, M. G. Management of Tomato spotted wilt virus in flue-cured tobacco with acibenzolar-S-methyl and imidacloprid. **Plant Disease**, v. 85, n. 3, p. 292-296, 2001.

DA CUNHA, T., FERRAZ, L. P., WEHR, P. P., & KUPPER, K. C. Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International journal of food microbiology**, v. 276, p. 20-27, 2018.

DE LIMA, L. D., BARBOSA, J. M. P., MEDEIROS, M. D. B. C. L., DE OLIVEIRA, M., DE CARVALHO, J. S. B., & MOREIRA, K. A. Avaliação bioquímica e fisiológica em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) submetida ao indutor de resistência acibenzolar-s-metil. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 4, p. 2374-2393, 2020.

DOUNGOUS, O., KHATABI, B., HANNA, R., TCHUANYO, M., KUATE, A. F., & FONDONG, V. N. Acibenzolar-S-methyl induces resistance against cassava mosaic geminiviruses in *Nicotiana benthamiana* and their vector *Bemisia tabaci* in cassava (*Manihot esculenta*). **Crop Protection**, v. 150, p. 105796, 2021.

DREHKOPF, S., OTTEN, C., & BÜTTNER, D. Recognition of a translocation motif in the regulator HpaA from *Xanthomonas euvesicatoria* is controlled by the type III secretion chaperone HpaB. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

DUANGMAL, K., & APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.

FALCÓN, A. B., CABRERA, J. C., COSTALES, D., RAMÍREZ, M. A., CABRERA, G., TOLEDO, V., & MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 103-112, 2008.

FLEISCHMANN. Disponível em <<https://www.fleischmann.com.br/produto/fermento-biologico-seco-instantaneo/>>. Acesso em 12. Abr 2022a

FONTENELLE, A. D. B., GUZZO, S. D., LUCON, C. M. M., & HARAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas*

euvesicatoria and *Alternaria solani* by *Trichoderma spp.* **Crop Protection**, v. 30, n. 11, p. 1492-1500, 2011.

FRATIANNI, F., D'ACIERNO, A., COZZOLINO, A., SPIGNO, P., RICCARDI, R., RAIMO, F., ... & NAZZARO, F. Biochemical characterization of traditional varieties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) of the Campania Region, Southern Italy. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 556, 2020.

GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 154-161, 2012.

GILL, S. S., & TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GODARD, J. F., ZIADI, S., MONOT, C., LE CORRE, D., & SILUÉ, D. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**, v. 18, n. 6, p. 397-405, 1999.

GUPTA, N., BALOMAJUMDER, C., & AGARWAL, V. K. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 176, n. 1-3, p. 1-13, 2010.

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

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.

HAHN, M. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annu. Rev. Phytopathol**, v.34, p.87-412. 1999.

HENRY, G., THONART, P., & ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *BASE*, 2012.

HYUN, M. W., YUN, Y. H., KIM, J. Y., & KIM, S. H. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, p. 257-265, 2011.

HOFFMANN, M. R. B., KUHN, O. J., STANGARLIN, J. R., BATTISTUS, A. G., STÜLP, J. L., & MEINERZ, C. C. Controle do cretamento bacteriano comum por

*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e óleo essencial de laranja em feijoeiro suscetível e moderadamente resistente. **Revista Cultivando o Saber**, v. 5, n. 4, p. 8-23, 2012.

IBGE. (2022). Produção de Pimentão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimentao/sp>. Accessed September 20, 2022.

JORDÁN, M., & CASARETTO, J. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. **Fisiología vegetal**. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile, 2006.

JUNG, W. J., JIN, Y. L., KIM, Y. C., KIM, K. Y., PARK, R. D., & KIM, T. H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, v. 30, n. 3, p. 645-652, 2004.

KEINATH, A. Controlling bacterial spot on tomato and pepper. 2019.

LIMA, M. A. G., PEIXOTO, A. R., BORGES, I. V., SILVA, M. S., BARBOSA, M. A. G., & CAVALCANTI, L. S. Induction of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola* in grapevine plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, 2017.

LISZKAY, A., VAN DER ZALM, E., & SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , and  $OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant physiology**, v. 136, n. 2, p. 3114-3123, 2004.

LIU, H., JIANG, W., BI, Y., & LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest biology and technology**, v. 35, n. 3, p. 263-269, 2005.

MACHO, A. P., & ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Molecular cell**, v. 54, n. 2, p. 263-272, 2014.

MARINGONI, A. C.; KIMATI, H. Sensibilidade in vitro de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro a drogas. **Summa Phytopathologica**, v. 13, n. 3-4, p. 160-172, 1987.

MAZARO, S. M., CITADIN, I., DE GOUVÊA, A., LUCKMANN, D., & GUIMARÃES, S. S. Induction of phytoalexins in cotyledons of soybean in response to the derivatives of leaf surinan cherry. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1824-1829, 2008.

MCMANUS, P. S., STOCKWELL, V. O., SUNDIN, G. W., & JONES, A. L. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 443-465, 2002.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 4, p. 466-471, 2009.

NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., & PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological reviews**, vol. 198, no 1, p. 249-266. 2004.

OJITO-RAMOS, K., PORTAL, O. Introducción al sistema inmune en plantas. **Bioteología vegetal**, v. 10, n. 1, 2010.

OKOT-KOTBER, M., LIAVOGA, A., YONG, K. J., & BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2410-2417, 2002.

OSDAGHI, E., TAGHAVI, S. M., HAMZEHZARGHANI, H., & LAMICHHANE, J. R. Occurrence and Characterization of the Bacterial Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on Pepper in Iran. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 10, p. 722-734, 2016.

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

PICCININ, E., DI PIERO, R. M., & PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.

POPOV, G., FRAITURE, M., BRUNNER, F., & SESSA, G. Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* type III effectors inhibit flg22-triggered immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 29, no 8, p. 651-660. 2016.

RESENDE, M. L. V., SALGADO, S. M., & CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

REUVENI, R.; BOTHMA, G. C. The relationship between peroxidase activity and resistance to *Sphaerotheca fuliginea* in melons. **Journal of Phytopathology**, v. 114, n. 3, p. 260-267, 1985.

RITCHIE, D. F., MELANDER, C., HUIGENS, R. W., ROGERS, S. A., & CAVANAGH, J. Potential for a bromoageliferin analogue biofilm inhibitor-dispersant to enhance control of phytopathogenic bacterial diseases. In: PHYTOPATHOLOGY. 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: **AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC.** p. S108-S109. 2009

ROMERO, A. M.; KOUSIK, C. S.; RITCHIE, D. F. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**, v. 85, n. 2, p. 189-194, 2001.

RYAN, C. A., HUFFAKER, A., & YAMAGUCHI, Y. New insights into innate immunity in Arabidopsis. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1902-1908, 2007.

SÁNCHEZ, G. R., MERCADO, E. C., PEÑA, E. B., DE LA CRUZ, H. R., & PINEDA, E. G. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. **Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 90-95, 2010.

SCHWESSINGER, B., & ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008.

SEGONZAC, C., & ZIPFEL, C. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 1, p. 54-61, 2011.

SHIMADA, S., ANDOU, M., NAITO, N., YAMADA, N., OSUMI, M., & HAYASHI, R. Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 123-131, 1993.

SOYLU, S., BAYSAL, Ö., & SOYLU, E. M. MINE. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, v. 165, n. 5, p. 1069-1075, 2003.

STASKAWICZ, B. J., AUSUBEL, F. M., BAKER, B. J., ELLIS, J. G., & JONES, J. D. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 661-667, 1995.

SYNGENTA. Bion. Disponível em < SYNGENTA. <https://www.syngenta.cl/product/crop-protection/bionr-50-wg>>. Acesso em 01. Jan 2022a.

TAITI, C., COSTA, C., MIGLIORI, C. A., COMPARINI, D., FIGORILLI, S., & MANCUSO, S. Correlation between volatile compounds and spiciness in domesticated and wild fresh chili peppers. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 8, p. 1366-1380, 2019.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M., & MURPHY, A. Fisiologia vegetal. In: Fisiologia vegetal. p. 848-848. 2009.

TOBIMATSU, Y., & SCHUETZ, M. Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well?. **Current opinion in biotechnology**, v. 56, p. 75-81, 2019.

UTAMI, D., MEALE, S. J., & YOUNG, A. J. A Pan-Global Study of Bacterial Leaf Spot of Chilli Caused by *Xanthomonas spp.* **Plants**, v. 11, n. 17, p. 2291, 2022.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 18, n. 1, p. 259-288, 1980.

WORTHINGTON, R. J., Rogers, S. A., Huigens III, R. W., Melander, C., & Ritchie, D. F. Foliar-applied small molecule that suppresses biofilm formation and enhances control of copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper. **Plant disease**, v. 96, n. 11, p. 1638-1644, 2012.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 138-143, 1998.

YOUSSEF, M. M. A.; SOLIMAN, Maha M. Effect of integrated management on *Meloidogyne incognita* infecting *Egyptian henbane*, *Hyoscyamus muticus* and on subsequent cowpea plant. In: 1st **Scientific Conference of Agricultural Sciences**, Fac. Agric., Assiut Univ., Assiut. p. 585-594. 1997.

ZANARDO, N. M. T., PASCHOLATI, S. F., & FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1499-1503, 2009.

ZHANG, J., LI, W., XIANG, T., LIU, Z., LALUK, K., DING, X., ... & ZHOU, J. M. Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune

receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 4, p. 290-301, 2010.

## 6 CAPÍTULO IV: Efeito da babosa (*Aloe barbadensis*) no controle da mancha foliar de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em pimentão

### Resumo

No Brasil, uma das hortaliças mais cultivadas é o pimentão (*Capsicum annuum*), com uma produção de 350 mil toneladas e estabelecida em aproximadamente 13 mil hectares. Dentre os problemas fitossanitários que afetam a cultura se encontram as manchas foliares causadas pela bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, a qual compromete a produção já que afeta a planta em qualquer fase de seu desenvolvimento. O controle da mancha bacteriana baseia-se na implementação de cultivares resistentes e no uso de agrotóxicos, atividades que ao longo do tempo intensificam a pressão de seleção de bactérias resistentes aos produtos disponíveis no mercado, acarretando assim problemas ambientais e à saúde humana. Uma alternativa para controlar esta bacteriose na cultura de pimentão é a indução de resistência através da ativação dos mecanismos de defesa da planta, mediante o uso de produtos de baixo impacto ambiental, como a babosa. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito protetor em plantas de pimentão pulverizadas com frações polissacarídicas de babosa (*Aloe barbadensis*), e desafiadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. A partir do gel de folhas de babosa foram obtidas, mediante precipitação etanólica para floculação de polissacarídeos de alto peso molecular, duas frações polissacarídicas uma de coloração branca (Bab FB) e outra de coloração rosa (Bab FR). Inicialmente a Bab FB foi avaliada a 0,5, 1,5 e 3 mg/mL, autoclavada a 120°C por 20 minutos e aplicada nas plantas 3 dias antes da inoculação (DAi). Com a finalidade de saber qual modo de preparo das frações é mais eficiente para reduzir os sintomas da doença, ambas as frações foram submetidas a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento (30 min a 100°C, 20 min a 120°C ou 30 min a 60°C) e aplicadas 3 dias antes da inoculação. Finalmente foi verificada a influência do intervalo de aplicação da Bab FB e da Bab FR a 3 mg/mL (aquecidas por 30 minutos a 100°C), aplicadas 3 ou 7 dias antes da inoculação, e comparadas com o indutor ASM a 50 ppm do ingrediente ativo. Foi observado que a Bab FB a 0,5, 1,5 ou 3 mg/mL e aquecida a 120°C por 30 minutos não reduziram a severidade dos sintomas. Já a Bab FB e a Bab FR, ambas a 3 mg/mL e aquecidas por 30 minutos a

100°C, reduziram a severidade da doença aos 28 e 21 dias após a inoculação (DAI). No entanto, no experimento posterior, tanto a Bab FB como a Bab FR, ambas a 3 mg/mL, aquecidas a 100°C por 30 minutos e aplicadas 3 ou 7 dias antes da inoculação, não reduziram significativamente a severidade dos sintomas de mancha bacteriana. Estes resultados mostraram que as frações polissacarídicas de babosa não apresentam um efeito consistente na redução da severidade dos sintomas, enquanto o ASM mostrou-se sempre superior em reduzir a severidade da doença em todos os experimentos.

**Palavras-chave:** mancha foliar, controle alternativo, frações polissacarídicas.

## Abstract

In Brazil, one of the most cultivated vegetables is bell pepper (*Capsicum annuum*), with a production of 350 thousand tons and established in approximately 13 thousand hectares. Among the phytosanitary problems that affect the crop are leaf spots caused by the bacterium *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, which compromises production as it affects the plant at any stage of its development. Bacterial leaf spot control is based on the implementation of resistant cultivars and the use of pesticides, activities that over time intensify the selection pressure of bacteria resistant to products available on the market, thus causing environmental and human health problems. An alternative to control this bacteriosis in the pepper crop is the induction of resistance through the activation of the plant's defense mechanisms, through the use of products with low environmental impact, such as aloe vera. The objective of this research is to evaluate the protective effect on sweet pepper plants sprayed with polysaccharide fractions from aloe vera (*Aloe barbadensis*), and challenged with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. From the gel of aloe leaves, two polysaccharide fractions were obtained, through ethanolic precipitation for flocculation of high molecular weight polysaccharides, one white (Bab FB) and the other pink (Bab FR). Initially, Bab FB was evaluated at 0.5, 1.5 and 3 mg/mL, autoclaved at 120°C for 20 minutes and applied to the plants 3 days before inoculation (DAi). In order to find out which way of preparing the fractions is more efficient to reduce the symptoms of the disease, both fractions were submitted to different temperatures and heating times (30 min at 100°C, 20 min at 120°C or 30 min at 60°C) and applied 3 days before inoculation. Finally, the influence of the application interval of Bab FB and Bab FR at 3 mg/mL (heated for 30 minutes at 100°C), applied 3 or 7 days before inoculation, and compared with the ASM inducer at 50 ppm was verified. Bab FB at 0.5, 1.5 or 3 mg/mL and heated at 120°C for 30 minutes did not reduce the severity of symptoms. Bab FB and Bab FR, both at 3 mg/mL and heated for 30 minutes at 100°C, reduced disease severity at 28 and 21 days after inoculation (DAI). However, in the following experiment Bab FB and Bab FR, both at 3 mg/mL, heated to 100°C for 30 minutes and applied 3 or 7 days before inoculation, did not significantly reduce the severity of bacterial spot symptoms. These results showed that the polysaccharide fractions of aloe vera do not have a consistent effect in reducing

the severity of symptoms, while ASM was always superior in reducing the severity of the disease in all experiments.

**Keywords:** leaf spot, alternative control, polysaccharide fractions.

## 6.1 Introdução

Uma das hortaliças mais cultivadas no mundo é o pimentão, a qual é utilizada principalmente para a produção de condimentos e conservas devido a seu aroma, sabor, diversificada coloração, e por ser rico em vitamina A, C e carotenoides (TAITI, 2019; FRATIANNI et al., 2020). No Brasil, a cultura do pimentão é estabelecida em mais de 13 mil hectares, proporcionando uma produção anual de 350 mil toneladas, e rendimentos médios de até 50 toneladas em cultivos ao ar livre e até 150 toneladas em ambiente protegido (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI e FRUTI, 2019).

Uma das problemáticas fitossanitárias na cultura de pimentão são as bacterioses, entre elas a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (DREHKOP; OTTEN e BÜTTNER, 2022). A mancha bacteriana do pimentão afeta esta cultura em qualquer fase de seu desenvolvimento, provocando necrose e abscisão prematura de folhas, prejudicando a síntese de pigmentos fotossintéticos (AGUIAR et al., 2003; MORETTI et al., 2009; WORTHINGTON et al., 2012).

Apesar da disponibilidade de cultivares resistentes à mancha bacteriana, estes não apresentam sucesso sem o uso de medidas adicionais como o controle químico (POTNIS, 2019). O controle químico desta bacteriose é realizado mediante a aplicação de antibióticos como o sulfato de estreptomicina ou a oxitetraciclina e produtos à base de cobre, estes últimos caracterizando-se por apresentar efeito negativo ao meio ambiente, já que a geração de isolados de bactérias resistentes a este produto aumenta o volume de aplicação e, por conseguinte os custos ambientais e de produção (MARINGONI e KIMATI, 1987; MCMANUS et al., 2002). Em vista que no Brasil já foram registradas ocorrências de *Xanthomonas* resistentes ao cobre (MARINGONI e KIMATI, 1987; AGUIAR et al., 2000; RITCHIE et al., 2009), métodos alternativos e sustentáveis devem ser encontrados para controlar esta doença bacteriana. Um desses métodos é a ativação dos mecanismos de defesa da planta.

Entre os produtos capazes de ativar mecanismos de resistência de plantas se encontra o Bion®, que apresenta como ingrediente ativo o acibenzolar-S-Metil (ASM), um análogo do ácido salicílico que se caracteriza por não apresentar efeito direto sobre patógenos (SYNGENTA, 2022). O produto está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para controlar clorose variegada

(*Xylella fastidiosa*) em citros, pinta bacteriana em tomate (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) mancha bacteriana em tomate (*Xanthomonas vesicatoria*), e mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) em algodão, bacterioses (*Xanthomonas axonopodis* e *Pseudomonas cichori*) em eucalipto, crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) em feijão e mancha aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*) em melão. Além disso, no capítulo anterior desta pesquisa observou-se que o ASM, utilizado como um tratamento referência, reduziu significativamente a mancha bacteriana do pimentão.

Existem evidências que a babosa (*Aloe barbadensis* M.) apresenta potencial no controle de fitopatógenos, devido à presença de compostos antimicrobianos como fenóis, ácidos orgânicos e inorgânicos, e polissacarídeos como a acemanana, esta última considerada como a principal substância ativa da planta (FEMENIA et al., 1999; LUIZ et al., 2016). Tem sido reportado que polissacarídeos de babosa reduzem a severidade da mancha angular em morangueiro (*Xanthomonas fragariae*) (LUIZ et al., 2017); ativam as enzimas peroxidase, polifenoloxidase e glucanase e diminuem a severidade de manchas foliares (*Xanthomonas gardneri*) em tomateiros (LUIZ; ROCHA NETO e DI PIERO, 2015), ou que induzem ao acúmulo de fitoalexinas em plantas de sorgo (STANGARLIN et al. 1999).

Produtos de origem natural provenientes da babosa, atuando de modo distinto aos agroquímicos convencionais, poderiam se constituir em uma alternativa ao controle de doenças de plantas. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de frações polissacarídicas de babosa no controle da mancha bacteriana de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em pimentão, comparando-as com o indutor ASM, o qual se mostrou efetivo em trabalhos anteriores.

## **6.2 Material e métodos**

### **6.2.1 Semeadura do pimentão**

Em casa de vegetação, sementes de pimentão cv. Rubi Gigante (Feltrin®) disponíveis nas lojas agropecuárias da região de Florianópolis, foram semeadas em células preenchidas com substrato comercial Caroline®. Três semanas após a semeadura, foram transplantadas duas plântulas por vaso de 5 litros contendo solo

vermelho com turfa numa proporção 3:1. As plantas foram adubadas duas vezes durante cada experimento com N-P-K (10-10-10) 10 gL<sup>-1</sup>, colocando 10 mL por vaso.

### **6.2.2 Extração de frações polissacarídicas da babosa e preparo das suspensões**

Para a extração das frações polissacarídicas, folhas de babosa foram cedidas pela empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda (Paulo Lopez, SC). As folhas foram lavadas em água da torneira e com detergente e descascadas. O gel (parênquima de reserva) foi extraído, triturado em liquidificador e misturado com álcool 92° em uma proporção de 3:1. Esta mistura foi mantida em câmara fria a 4°C por 24 horas para a floculação de polissacarídeos de alto peso molecular. Passado o período de refrigeração com uma peneira foi filtrada a mistura e obtida uma primeira fração polissacarídica de coloração branca (Bab FB). O restante da suspensão permaneceu a 4°C por 72 horas, quando foi novamente filtrada, obtendo-se uma segunda fração polissacarídica de coloração rosa (Bab FR). Ambas as frações Bab FB e Bab FR foram secas em estufa a 45°C até obter um peso constante, trituradas em moinho analítico e armazenadas no freezer a -20°C. Antes de serem aplicadas nas plantas, as frações foram suspensas em água destilada e homogeneizadas no Ultra-Turraz a 2000 rpm por 15 minutos e, dependendo do experimento, foram aquecidas por 30 min a 100°C, 20 min a 120°C ou 30 min a 60°C e posteriormente incubadas a 4 °C por 12 horas.

### **6.2.3 Preparo e calibração do inóculo bacteriano**

Para a calibração do inóculo o isolado 112-P de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* fornecido pela Embrapa Hortaliças e conservado em tampão fosfato foi repicado em placas de petri contendo meio Nutriente Ágar (28 g.L<sup>-1</sup>) e mantidos a 25°C por 48 horas. Após o período de incubação foi preparada uma suspensão bacteriana correspondente a uma absorbância de 0,6 unidades a 600 nm lidas em espectrofotômetro (Molecular Devices Beckman Paradigm Multi-Mode Microplate Reader), que equivale aproximadamente a 1 x 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL<sup>-1</sup>.

#### **6.2.4 Efeito da aplicação das frações polissacarídicas de babosa e ASM sobre a severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão cv. Rubi Gigante**

Foram realizados quatro experimentos em casa de vegetação com plantas da cv. Rubi Gigante. Como testemunha plantas foram pulverizadas com água destilada (controle negativo) ou com ASM a 50 ppm do ingrediente ativo (controle positivo).

Em todos os experimentos as plantas foram pulverizadas com as frações polissacarídicas da babosa no estágio de sete folhas (7 mL por vaso) e dependendo do experimento, as plantas foram inoculadas 3 ou 7 dias depois com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas para facilitar a abertura dos estômatos e garantir a infecção e colonização da bactéria. Passados 14 dias da inoculação, a cada 7 dias e por um período de 28 dias foram avaliados visualmente a severidade dos sintomas causados pela bactéria (porcentagem de área de folha afetada) da terceira e quarta folha de abaixo para acima.

No primeiro experimento, foi avaliada a fração branca da babosa (Bab FB) a 0,5, 1,5 e 3 mg/mL, autoclavadas a 120°C por 20 minutos e aplicada nas plantas 3 dias antes da inoculação (DAi). No segundo experimento, foram avaliadas as frações branca (Bab FB) e rosa (Bab FR) da babosa a 3 mg/mL submetidas a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento (20 min a 120°C, 30 min a 100°C, ou 30 min a 60°C) e aplicadas 3 DAi. Já no terceiro e quarto experimento, as frações Bab FB e Bab FR a 3 mg/mL (aquecidas por 30 minutos a 100°C) foram comparadas com o indutor comercial acibenzolar-S-metil (ASM), a 50 ppm do ingrediente ativo. Os produtos foram aplicados nas plantas de pimentão aos 3 ou 7 dias antes da inoculação das plantas.

#### **6.2.5 Delineamento experimental e análise de dados**

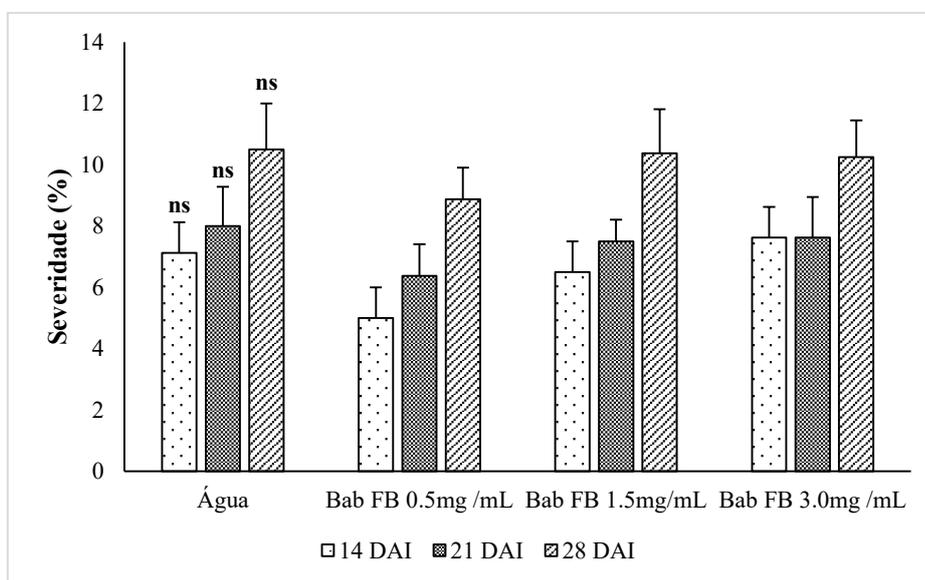
Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e com um delineamento inteiramente casualizado. A unidade experimental esteve representada por um vaso contendo duas plantas de pimentão. As análises de severidade da doença foram realizadas utilizando 6 repetições por tratamento. Os dados da severidade foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e quando

significativo as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). O pressuposto da homogeneidade das variâncias foi realizado pelo teste Levene. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise estatística SISVAR 5.6.

### 6.3 Resultados

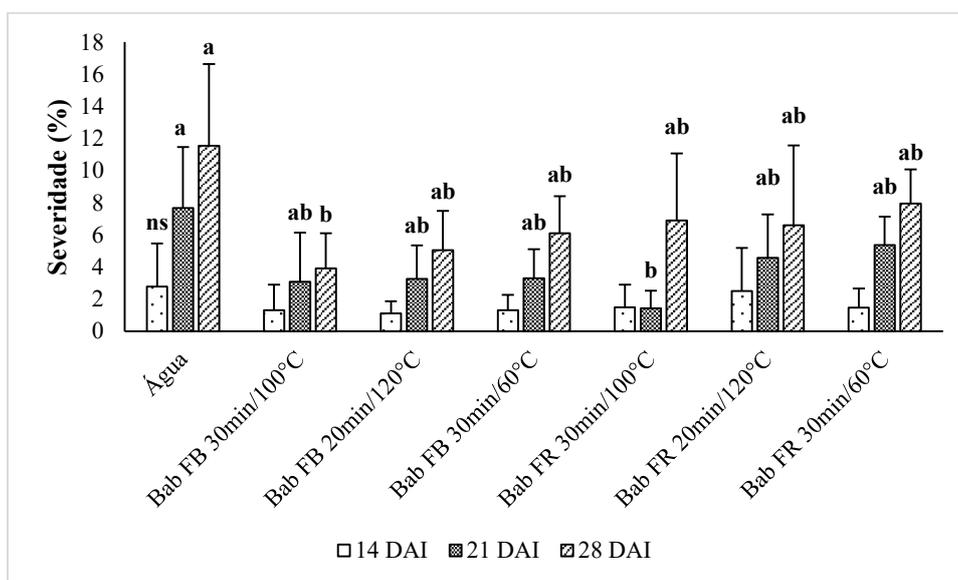
#### 6.3.1 Efeito da aplicação de Bab FB, Bab FR e ASM sobre a severidade de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão

Inicialmente, as plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas 3 dias antes da inoculação (DAi) com Bab FB nas concentrações de 0.5, 1.5 e 3.0 mg/mL, a partir de suspensões de polissacarídeos aquecidas a 120°C por 30 minutos, não apresentaram uma redução significativa na severidade da doença quando comparadas com as plantas controle (tratadas com água) aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI) (Figura 31).



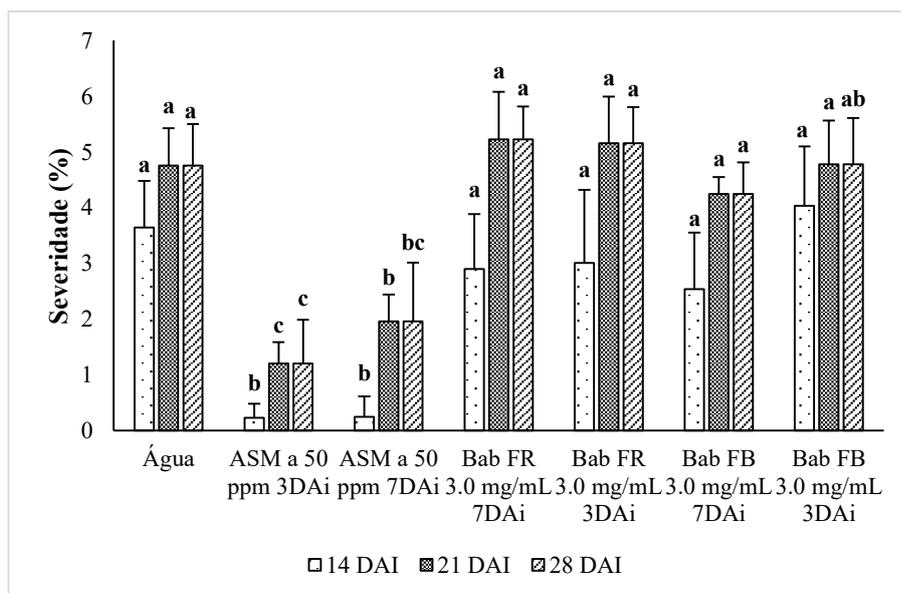
**Figura 31.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada ou fração branca de babosa (Bab FB) a 0.5, 1.5 e 3 mg/mL aquecidas a 120°C por 20 minutos, 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Ns: não significativo pelo teste Tukey a 5%.

Submetendo-se as frações de babosa a diferentes combinações de tempo/temperatura, foi observado que na cultivar Rubi Gigante, a Bab FB a 3 mg/mL, aquecida 30 minutos a 100°C e aplicada 3 dias antes da inoculação reduziu significativamente a severidade da doença apenas aos 28 DAI, em aproximadamente 70% (Figura 32). A fração rosa da babosa (Bab FR) também teve efeito apenas quando submetida a 100°C/30 minutos, no caso reduzindo a severidade da bacteriose aos 21 dias após a inoculação (Figura 32).

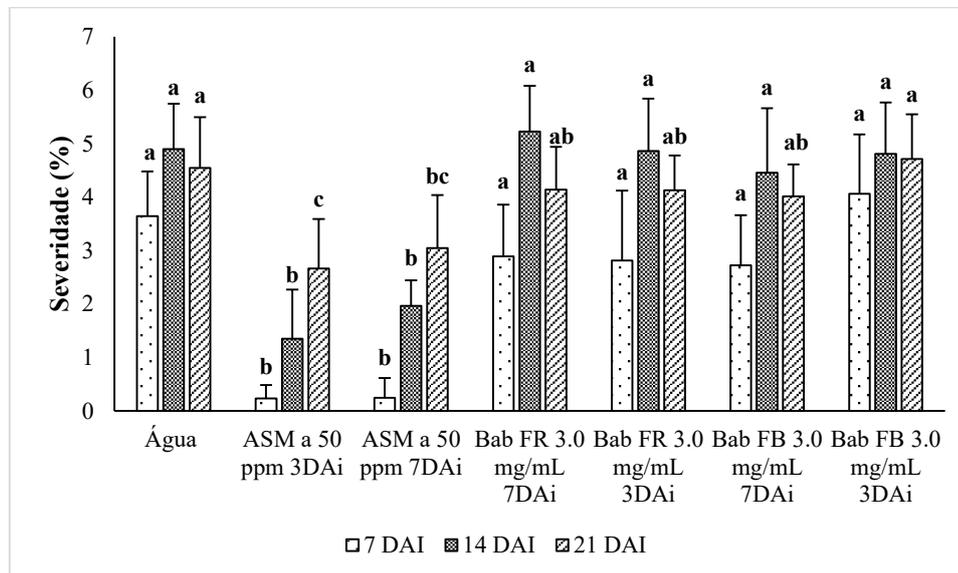


**Figura 32.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, fração branca (Bab FB) e fração rosa da babosa (Bab FR) a 3mg/mL, submetidas a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento (20 min a 120°C, 30 min a 100°C, ou 30 min a 60°C), 3 dias antes da inoculação com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação iniciou 14 dias após a inoculação (DAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Ns: não significativo. Os dados deste experimento foram transformados mediante a raiz quadrada.

Realizando-se mais dois novos experimentos com Bab FB e Bab FR a 3 mg/mL, com aquecimento das frações a 100°C por 30 minutos e aplicação aos 3 ou 7 dias antes da inoculação (DAi), não foram encontradas diferenças significativas para a severidade da doença em todas as avaliações quando comparadas com as plantas controle. Contudo se observa que as plantas pulverizadas com ASM a 50 ppm 3 ou 7 DAi apresentaram uma redução significativa da severidade da doença entre 30 e 70% (Figuras 33 e 34).



**Figura 33.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm, ou fração branca (Bab FB), e fração rosa da babosa (Bab FR) a 3mg/mL (aquecidas 30 minutos a 100°C) 3 e 7 dias antes da inoculação (DAi) com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Os dados deste experimento foram transformados mediante a raiz quadrada.



**Figura 34.** Severidade de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* em plantas de pimentão Rubi Gigante pulverizadas com água destilada, ASM a 50 ppm, ou fração branca (Bab FB), e fração rosa da babosa (Bab FR) a 3mg/mL (aquecidas 30 minutos a 100°C) 3 e 7 dias antes da inoculação (DAi) com *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ( $A_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). A avaliação foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação (DAI). Médias com diferentes letras diferem significativamente entre si dentro do mesmo tempo de avaliação pelo teste Tukey a 5% de significância. Os dados deste experimento foram transformados mediante o logaritmo de (n+1).

## 6.4 Discussão

A ativação dos mecanismos de defesa de plantas mediante o uso de indutores de resistência é uma estratégia alternativa que ajuda no controle de doenças. Nesta pesquisa para reduzir a severidade da mancha bacteriana do pimentão foram testadas diferentes concentrações e intervalos de aplicação de polissacarídeos de babosa, comparando-as com um produto comercial à base de ASM.

Diferentes pesquisas têm demonstrado o potencial da babosa em controlar bacterioses em plantas (LUIZ et al., 2012; LUIZ et al., 2017). Dessa forma, avaliou-se uma fração polissacarídica branca (Bab FB) e uma fração polissacarídicas rosa (Bab FR) obtidas do gel de babosa na redução da severidade da mancha bacteriana do pimentão (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*).

Inicialmente, a Bab FB autoclavada a 120°C por 20 minutos, e testada em diferentes concentrações, não reduziu a severidade da mancha bacteriana, independente da concentração utilizada (Figura 31). Em relação a isto, presume-se que as altas temperatura e pressão durante a autoclavagem da fração comprometeram as ligações entre aglomerados de monossacarídeos, e isto, provavelmente afetou negativamente o potencial antimicrobiano desta fração, ou seu efeito elicitor.

Supõe-se que a autoclavagem da Bab FB ao quebrar ligações entre monossacarídeos tornou essa fração irreconhecível aos receptores da planta, e, por conseguinte não ocorreu ativação dos mecanismos de defesa vegetal. Também se sugere que a quebra de aglomerados de monossacarídeos da Bab FB causada pela autoclavagem, evitou que esta fração formasse um filme contínuo na superfície das folhas, o qual poderia auxiliar na redução da infecção bacteriana.

Já que a Bab FB autoclavada não reduziu os sintomas da doença, no experimento seguinte a Bab FB e a Bab FR ambas a 3 mg/mL foram submetidas a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento, na tentativa de se obter uma fração polissacarídica cujo tamanho dos fragmentos atuasse como elicitor em pimentão.

Quando a Bab FB e a Bab FR foram aquecidas por 30 minutos a 100°C, foi observado que a fração branca reduziu a severidade da doença aos 28 dias após à inoculação (DAI), e a fração rosa aos 21 DAI (Figura 32). Entretanto, essa ação

protetora não foi confirmada nos experimentos seguintes, quando as frações foram aplicadas 3 ou 7 dias antes da inoculação das plantas (Figura 33 e 34).

Apesar que no presente estudo a Bab FB e a Bab FR da babosa não preveniram a infecção nem reduziram os sintomas de manchas foliares de maneira consistente (Figura 31, 33 e 34), é importante destacar que outros pesquisadores têm encontrado resultados positivos utilizando babosa no controle de doenças bacterianas de humanos e plantas. Por exemplo, Pandey e Mishra (2010) encontraram que o extrato etanólico líquido de babosa inibiu o crescimento *in vitro* de diferentes bactérias Gram-negativas e Gram positivas de humanos, e relacionaram os resultados com a atividade antibacteriana deste extrato.

Já em plantas, Luiz et al. (2017) comprovaram que a suspensão aquosa de polissacarídeo de babosa reduziu a severidade da mancha angular (*X. fragariae*) do morangueiro em até 44%, enquanto que, em tomate, Luiz et al. (2012) observaram que polissacarídeos de babosa a 1,5 mg/mL, quando aquecidos a 50°C por 60 minutos ou a 100°C por 30 minutos, reduziram a severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) em até 51.5%. Esses autores atribuíram a redução da doença a oligossacarídeos presentes nestas frações, os quais ao atuar como elicitores, induziram na planta a atividade de enzimas relacionadas à defesa como peroxidase, polifenoloxidase e glucanase.

Uma das possíveis causas sobre o insucesso para reduzir a mancha bacteriana do pimentão com Bab FB e Bab FR, é a carência de compostos com atividade antimicrobiana como a acemanana, a aloerida ou antraquinonas nestas frações. Presume-se que as folhas de babosa utilizadas para a extração das frações possivelmente não apresentavam suficientes compostos antimicrobianos, ou bem, que durante a extração das frações, possivelmente foram degradados compostos antimicrobianos ou moléculas elicitoras, os quais em sinergia seguramente teriam contribuído em amenizar os sintomas causados por *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

Em alguns dos experimentos, também foi utilizado um produto a base de ASM, o qual é comercializado como um ativador de mecanismos de defesa de plantas. Foi observado que o ASM pulverizado 3 ou 7 DAi reduziu a severidade da mancha bacteriana entre 30 e 70% (Figuras 33 e 34). Presume-se que o ASM, um análogo do ácido salicílico, agiu nas plantas de pimentão como uma molécula sinalizadora, induzindo à expressão de genes e síntese de enzimas de defesa de plantas

relacionadas à rota do ácido salicílico, a qual está envolvida principalmente contra o ataque de patógenos biotróficos ou hemibiotróficos (SÁNCHEZ et al., 2010) como é o caso da *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*.

A utilização do ASM nos experimentos demonstrou que havia ambiente propício para que as plantas de pimentão tivessem seus mecanismos de defesa ativados e a não proteção das plantas pela babosa contra a bacteriose deve-se, em parte, à ausência de elicitores nas frações polissacarídicas ou ao não reconhecimento destas pelo pimentão.

## **6.5 Conclusões**

Desta pesquisa conclui-se que frações polissacarídicas de babosa não reduzem a severidade da mancha bacteriana do pimentão de maneira consistente. Por tais circunstâncias, outros estudos devem ser conduzidos onde se purifiquem e se testem no controle da doença componentes elicitores presentes nas frações polissacarídicas da babosa. Do mesmo modo, outros estudos utilizando o gel de babosa sem processar devem ser realizados para determinar se apresenta potencial para reduzir esta doença do pimentão.

## Referências

AGUIAR, L. A., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. D. L. D., AKIBA, F., CARMO, M. G. F. D. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. **Horticultura Brasileira**, vol. 21, no 1. 2003.

AGUIAR, L., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. L. D., AKIBA, F., CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Agronomia**, vol. 34, no 1. 2000.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI. **Brazilian Horti & Fruti Yearbook**. Santa Cruz do Sul, Editora Gazeta, p 96p, 2019.

DREHKOPF, S., OTTEN, C., & BÜTTNER, D. Recognition of a translocation motif in the regulator HpaA from *Xanthomonas euvesicatoria* is controlled by the type III secretion chaperone HpaB. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

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

FRATIANNI, F., D'ACIERNO, A., COZZOLINO, A., SPIGNO, P., RICCARDI, R., RAIMO, F., ... & NAZZARO, F. Biochemical characterization of traditional varieties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) of the Campania Region, Southern Italy. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 556, 2020.

LUIZ, C., SCHAUFFLER, G. P., LEMOS-BLAINSKI, J. M., ROSA, D. J., & DI PIERO, R. M. Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p. 170-177, 2016.

LUIZ, C., DA ROCHA NETO, A. C., FRANCO, P. O., & DI PIERO, R. M. Emulsions of essential oils and Aloe polysaccharides: antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 370-381, 2017.

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

LUIZ, C., FELIPINI, R. B., COSTA, M. E. B., & DI PIERO, R. M. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 2, p. 387-393, 2012.

MARINGONI, A. C.; KIMATI, H. Sensibilidade in vitro de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro a drogas. **Summa Phytopathologica**, vol. 13, no 3-4. 1987.

MCMANUS, P. S., STOCKWELL, V. O., SUNDIN, G. W., & JONES, A. L. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 443-465, 2002.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 4, p. 466-471, 2009.

PANDEY, R., & MISHRA, A. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, p. 1356-1361, 2010.

POTNIS, N., BRANHAM, S. E., JONES, J. B., & WECHTER, W. P. Genome-wide association study of resistance to *Xanthomonas gardneri* in the USDA pepper (*Capsicum*) collection. **Phytopathology**, v. 109, n. 7, p. 1217-1225, 2019.

RITCHIE, D. F., MELANDER, C., HUIGENS, R. W., ROGERS, S. A., & CAVANAGH, J. Potential for a bromoageliferin analogue biofilm inhibitor-dispersant to enhance control of phytopathogenic bacterial diseases. In **PHYTOPATHOLOGY** (Vol. 99, No. 6, pp. S108- S109). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC. 2009.

TAITI, C., COSTA, C., MIGLIORI, C. A., COMPARINI, D., FIGORILLI, S., & MANCUSO, S. Correlation between volatile compounds and spiciness in domesticated and wild fresh chili peppers. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 8, p. 1366-1380, 2019.

SÁNCHEZ, G. R., MERCADO, E. C., PEÑA, E. B., DE LA CRUZ, H. R., & PINEDA, E. G. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. **Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 90-95, 2010.

STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., & NOZAKI, M. H. Medicinal plants and alternative control of phytopathogens. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, vol. 11, p. 16-21. 1999.

SYNGENTA. Bion. Disponível em < <https://www.syngenta.com.br/product/crop-protection/ativador-de-plantasfungicida/bion-500-wg>>. Acesso em 07. Out 2022b.

WORTHINGTON, R. J., ROGERS, S. A., HUIGENS III, R. W., MELANDER, C., & RITCHIE, D. F. Foliar-applied small molecule that suppresses biofilm formation and enhances control of copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper. **Plant disease**, v. 96, n. 11, p. 1638-1644, 2012.

## 7 Conclusão geral e perspectivas

No mundo e no Brasil, há uma demanda crescente para a incorporação de novas tecnologias para o manejo de recursos genéticos vegetais, entre eles o pimentão. Por tais circunstâncias, limitações como a expansão da fronteira agrícola e a necessidade de compatibilizar a produção agrícola com a conservação ambiental, e a melhora da qualidade de vida, exigem uma maior eficiência nos processos relacionados com a produção de cultivares de pimentão, através da implementação de tecnologias apropriadas.

Certamente, a estratégia mais comum para manter a variabilidade de espécies de grande importância econômica como pimentão é a conservação de seus recursos genéticos. Por tais circunstâncias, estudos ecológicos, demográficos, inventários de populações naturais, implementação de técnicas de prospecção, coleta, conservação de germoplasma, realização de estudos demográficos e inventários de populações naturais de pimentão são necessários para encontrar fontes de resistência que possam ser utilizadas nos programas de melhoramento genético para conter o ataque de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* nesta cultura.

Por tais circunstâncias, o uso de recursos genéticos presentes nos bancos de germoplasma de pimentão deve ser potencializado, através da caracterização e agregando valor ao germoplasma conservado, que permitam a melhoradores tomar decisões sobre quais materiais devem ser utilizados nos programas de melhoramento, potencializando assim o uso do germoplasma desta hortaliça. Contudo, em vista que no estado Santa Catarina não estão identificadas as raças de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* que infectam o pimentão, outros estudos devem ser realizados para identificar os genes de avirulência presentes nas raças de do estado de SC, para posteriormente criar cultivares de pimentão que apresentem genes de resistência que possam reconhecer estes genes de avirulência bacteriana nos campos de produção catarinenses e fazer o controle desta doença de modo eficiente.