

VALDEIR NUNES CARVALHO

**COMPOSTOS ESTRUTURAIS BACTERIANOS EXTRAÍDOS DE *Xanthomonas*
spp. COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA E AO
OÍDIO DO TOMATEIRO**

Botucatu

2022

VALDEIR NUNES CARVALHO

**COMPOSTOS ESTRUTURAIS BACTERIANOS EXTRAÍDOS DE *Xanthomonas*
spp. COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA E AO
OÍDIO DO TOMATEIRO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de plantas).

Orientador: Prof. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Botucatu

2022

C331c

Carvalho, Valdeir Nunes

Compostos estruturais bacterianos Extraídos de
Xanthomonas spp. como indutores de resistência à mancha
bacteriana e ao oídio do tomateiro / Valdeir Nunes Carvalho. -- ,
2023
129 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu,
Orientador: Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

1. Controle Biológico. 2. Fitopatologia. 3. Bacteriologia. 4.
Componentes biologicamente ativos. 5. Expressão gênica. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMPOSTOS ESTRUTURAIS BACTERIANOS EXTRAÍDOS DE *Xanthomonas* spp. COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA E AO OÍDIO DO TOMATEIRO

AUTOR: VALDEIR NUNES CARVALHO

ORIENTADOR: BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA (Participação Presencial)
Laboratório de Quarentena / Embrapa Meio Ambiente



Prof. Dr. NADSON DE CARVALHO PONTES (Participação Virtual)
Laboratório de Fitopatologia / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano



Pesquisadora Dr.^a ALINE CRISTINA VELHO (Participação Virtual)
/ Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina



Prof.^a Dr.^a ADRIANA ZANIN KRONKA (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu



Botucatu, 20 de dezembro de 2022

Dedico primeiramente a Deus por sempre iluminar meus caminhos;

Dedico a todos da minha família sem exceção por sempre está me apoiando e oferecendo o suporte necessário;

Dedico em especial a minha mãe Josefa Nunes Carvalho, a força motriz de todos os meus estudos, eu te amo;

Dedico a meu falecido pai José Teles Carvalho que está no céu, mas sempre olhando por mim;

Dedico a minha companheira, amiga e amor Vanessa Fernandes que sempre está do meu lado, nos momentos calmos e turbulentos, eu te amo;

Dedico a meus amigos que por onde andei eu adquiri e que foram fundamentais na minha vida;

A todos os funcionários da Embrapa Meio Ambiente que deram o suporte para esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e minha noiva pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, pela orientação, ensinamentos, paciência e exemplo de professor, pesquisador, sempre direcionando da melhor forma possível.

A todos os professores e funcionários da FCA.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

“É um velho preceito meu que é de capital importância para um jovem autor publicar (se for com o nome dele) apenas o que for muito bom e novo; de forma que o público creia nele e leia o que ele escreve”.

MOORE, J.; DESMOND, A. **Darwin**: a vida de um evolucionista atormentado. Tradução de Cynthia Azevedo. 4. ed. rev. e ampl. São Paulo: Geração Editorial, 2001. p. 616.

RESUMO

Dentre os elicitores envolvidos na ativação de respostas de defesa em plantas, alguns constituintes estruturais de bactérias fitopatogênicas, tais como: lipopolissacarídeos (LPS) e flagelina oriundas de bactérias do gênero *Xanthomonas* que desencadeia respostas de defesa nas plantas. Nesse estudo, foram realizadas análises de diferentes concentrações de extratos brutos de LPS e flagelos espécies não compatíveis de *Xanthomonas*, para verificar capacidade de reduzir a severidade da mancha bacteriana e oídio do tomateiro. Além disso, foram realizados estudos de atividades de enzimas e genes relacionados a defesa vegetal, teste com produtividade e diferentes modos de aplicação. Os testes para ajuste de concentração seguiram: DIC com 1 indutor LPS ou flagelos x 4 concentrações x 10 repetições. As concentrações: 10,6, 5,3, 2,65, 1,3 µg/ml e 16,7, 8,35, 4,17 e 2,08 µg/ml (LPS e Flagelos, respectivamente). As avaliações foram realizadas estimando-se a severidade da doença aos 7, 9, 12, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno. Os testes de produtividade e modo de aplicação seguiram em DIC: inoculado com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e não inoculados com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* x três modos de aplicação. Foram selecionadas 3 réplicas dos melhores tratamentos dos ensaios anteriores para a análise da expressão gênica em qPCR em tempo real com genes PAL e PPO (LPS) e PAL, PPO e POX (Flagelina). Na análise de flagelos foram avaliados também atividades enzimáticas relacionadas aos genes estudados para expressão. Nesses estudos, conclui-se que o LPS tem efeito positivo na concentração de 7,3 µg/ml, associando a eficiência na redução da severidade da mancha bacteriana, e os flagelos com a menor intensidade da doença estimada para uma concentração de 8,9 µg/mL. Ambos os elicitores desencadearam aumento da atividade de genes, e a flagelina é capaz de induzir enzimas de respostas de defesa. Os métodos PCV e o método via solo foram os métodos mais eficientes para LPS, e para flagelos o método via solo pode ser recomendado. Esses métodos aliaram menor severidade da doença e bons parâmetros de produtividade.

Palavras-chave: flagelina; indução de Resistência; pamps; controle alternativo; compostos naturais.

ABSTRACT

The elicitors involved in the activation of defense responses in plants, some constituents are symbols of phytopathogenic bacteria, such as lipopolysaccharides (LPS) and Flagellin from bacteria of the genus *Xanthomonas* that trigger defense responses in plants. In this study, an analysis of concentrations of LPS and crude flagella extracted from non-compatible species of *Xanthomonas* was carried out, verifying their ability to reduce the severity of bacterial spot and powdery mildew in tomato, studies of enzyme activities and genes related to plant defense, productivity test and modes of application. Tests for concentration adjustment followed in DIC with 1 LPS inducer or flagella x 4 concentrations x 10 repetitions. The collected concentrations were 10.6, 5.3, 2.65, 1.3 µg/ml and 16.7, 8.35, 4.17, and 2.08 µg/ml (LPS and Flagella, respectively). Estimates were performed by estimating disease severity at 7, 9, 12, 14, and 21 days after pathogen inoculation. The testicles of productivity and mode of application followed in DIC: inoculated with *X. euvesicatoria* pv. *perforans* and not inoculated with *X. euvesicatoria* pv. *perforans* x three application modes. Powdery mildew analyzes followed after the appearance of a generalized epidemic in the trial. Three replicates of the best treatments from previous trials were selected for analysis of gene expression in real time qPCR with PAL and PPO (LPS) and PAL, PPO, and POX (Flagellin) genes. In the analysis of flagella, enzymatic activities related to the genes studied for expression were also evaluated. In these studies, it is concluded that LPS has a positive effect at a concentration of 7.3 µg/ml, associating efficiency in reducing the severity of bacterial spot without deleterious effects to plants, and flagella with the lowest disease intensity designed for a concentration of 8.9 µg/ml. The elicitors reduced the severity of tomato bacterial spot and help to contain the tomato powdery mildew epidemic. Both elicitors increased gene activity, and flagelin are capable of inducing defense response enzymes. The PCV methods and the soil method were the most efficient, as they were able to align less disease severity and good productivity parameters, providing a better indication to the producer in terms of agronomic management.

Keywords: flagelin; induce resistance; pamps; alternative control; natural compounds.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
CAPÍTULO 1 - EFEITO DE DIFERENTES MODOS DE APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NO CONTROLE DO OÍDIO DO TOMATEIRO.....	21
1.1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	23
1.2.1 A cultura do tomateiro, mancha bacteriana e o oídio do tomateiro.....	23
1.2.2 Indução de resistência aspectos gerais.....	26
1.2.3 Fatores bióticos na indução de resistência.....	28
1.2.4 Fatores abióticos na indução de resistência.....	29
1.2.5 Padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs.....	29
1.2.6 Lipopolissacarídeos.....	31
1.2.7 Polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (PAL).....	32
1.2.8 Análise de expressão gênica através de PCR em tempo real.....	33
1.2.9 Tecnologia de aplicação.....	34
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
1.3.1 Aspectos gerais.....	35
1.3.2 Obtenção de lipopolissacarídeos.....	36
1.3.3 Teste de concentrações com LPS para ajustes de concentrações.....	36
1.3.4 Avaliação de diferentes tecnologias de aplicação e características agronômicas de plantas expostas ao elicitador e sua eficácia no controle da mancha bacteriana.....	37
1.3.5 Eficácia do extrato bruto de LPS no controle do oídio do tomateiro.....	39
1.3.6 Análise em qPCR em tempo real de genes-chaves relacionados ao sistema de defesa vegetal.....	39
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
1.5 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO 2 – UTILIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE FLAGELOS DE <i>Xanthomonas</i> spp. NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA E ATIVIDADES DIFERENCIAIS DE ENZIMAS E	

GENES RELACIONADOS À DEFESA DA PLANTA.....	68
2.1 INTRODUÇÃO.....	68
2.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	70
2.2.1 Gênero <i>Xanthomonas</i>	70
2.2.2 Manejo e controle da mancha bacteriana do tomateiro.....	70
2.2.3 Indução de resistência para bactérias fitopatogênicas.....	72
2.2.4 Flagelina como agente de indução de resistência.....	73
2.2.5 Enzimas e genes relacionados a indução de resistência em plantas.....	74
2.2.6 Técnica qPCR para análises de expressão gênica.....	76
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.3.1 Obtenção de extrato bruto de flagelina.....	78
2.3.2 Análise da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, teor de clorofila e determinação da atividade de peroxidase, polifenoloxidase e proteínas totais.....	79
2.3.3 Avaliação de atividades enzimáticas: obtenção do extrato bruto.....	79
2.3.4 Reações de peroxidase e polifenoloxidase.....	80
2.3.5 Quantificação de proteínas totais.....	80
2.3.6 Atividade diferencial dos genes das melhores respostas dos tratamentos na redução da severidade da doença.....	81
2.3.7 Teste de concentrações com extrato bruto de flagelina para ajuste de concentrações.....	82
2.3.8 Avaliação de respostas agronômicas de elicitores e tecnologias de Aplicação.....	82
2.3.9 Análise do controle do oídio de ocorrência espontânea, no tomateiro.....	84
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
2.5 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICE A – Arquivo suplementar 1 Parâmetros de síntese dos primers nesses estudos.....	122

APÊNDICE B – Arquivo suplementar 2 Procedimento padrão para obtenção de RNA extraído de folhas em plantas de tomateiro previamente aplicadas com os elicitores e infectadas com <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	123
APÊNDICE C – Arquivo suplementar 3 Esquema que demonstra como conduzir um bom estudo para ensaios de expressão gênica com o protocolo de extração de RNA utilizado neste documento e o passo a passo para o desenho de primers com o <i>software</i>	125
APÊNDICE D – Arquivo suplementar 4 Mini-protocolo de obtenção de extratos brutos de lipopolissacarídeos com o passo a passo de extração.....	126
APÊNDICE E – Arquivo suplementar 5 Mini-protocolo ilustrado de obtenção de extratos brutos de LPS.....	127
APÊNDICE F – Arquivo suplementar 6 Mini-protocolo de obtenção de extratos brutos de flagelos com o passo a passo de extração.....	128
APÊNDICE G – Arquivo suplementar 7 Mini-protocolo ilustrado de obtenção de extratos brutos de Flagelos	129

INTRODUÇÃO GERAL

As interações de reconhecimento de patógenos e seus hospedeiros envolvem reações bioquímicas desencadeadas por moléculas e estruturas que configuram o processo de infecção ou não no hospedeiro, cujas moléculas são denominadas fatores de reconhecimento (AGRIOS, 2005). E essa interação é coordenada por uma série de genes que coevoluíram entre plantas e patógenos (BOYD et al., 2013; MONAHAN et al., 2012). Portanto, podemos estabelecer a existência de relações de compatibilidade (suscetibilidade), incompatibilidade (resistência) durante a interação (KAZAN et al., 2001) baseadas em aspectos bioquímicos e genéticos. Segundo Dangl e Jones (2001) plantas resistentes e suscetíveis têm como diferença primordial, o reconhecimento do patógeno invasor e na eficiência dos mecanismos de defesa do hospedeiro que podem estar expressos ou necessitam de um processo iniciador, comumente estudadas como: Resistência sistêmica induzida (ISR), sendo esta que não ocorre acúmulo de proteínas relativas a patogênese e a resistência sistêmica adquirida (SAR) que ocorre além do acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese, pela promoção de respostas inespecíficas do hospedeiro (GAO et al., 2015).

Na SAR iniciadores ou elicitores podem ser configurados por ativadores químicos como, por exemplo, derivados de benzotiadiazólicos (BENHAMOU e BELENGER, 1998b), por microrganismos vivos e seus metabólitos secundário, assim como seus componentes celulares (LEEMAN et al., 1995). Nesse contexto, componentes estruturais de bactérias fitopatogênicas incompatíveis, como constituintes dos flagelos, sobretudo a flagelina, as cadeias do antígeno O e componentes de lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular bacteriana (DESAKI et al., 2006; NEWMAN et al., 2013; PROIETTI et al., 2014), têm sido intensamente estudadas para a produção de novos produtos a serem utilizados no manejo de doenças de plantas.

Esses compostos sendo sintetizados, portanto, após uma série de investigações genéticas e bioquímicas, comprovando ação indutora, a sua eficiência em condições controladas e em campo, através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) torna-se uma fonte rica para o desenvolvimento de novos formulados para o manejo de doenças em plantas.

A identificação de genes expressos na indução de resistência também é importante para entender os mecanismos de resistência de plantas contra

fitopatógenos (THATCHER et al., 2005). A técnica de qPCR para quantificação de genes expressos na defesa vegetal tem sido utilizada como forma de identificar e classificar agentes como indutores de resistência. Hael-conrad et al. (2018) obteve sucesso com a técnica avaliando a expressão de genes relacionados a indução após aplicação de uma proteína elicitadora chamada AsES em cultivo de morangos.

Nas análises enzimáticas com espectrofotometria, envolvendo espécies reativas de oxigênio e outras enzimas como as quitinases e as glucanases são, sobretudo, indicadoras do desencadeamento de resposta de resistência, conforme descrito por Heiser e Obwald, (2008). Estes aspectos levantados serão importantes para o controle de doenças em plantas com difícil manejo, antes da infecção. Como podemos destacar a mancha bacteriana do tomateiro que possui múltiplos agentes causais *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xanthomonas vesicatoria*; *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* e *Xanthomonas gardneri* que ocasionam inúmeros cultivos de tomate no Brasil e no Estado de São Paulo. No Brasil a espécie de maior prevalência é a espécie *X. perforans* (ARAÚJO et al., 2016).

Tendo em vista a baixa eficiência de produtos químicos baseadas em aplicações de produtos cúpricos, que fazem pressão de seleção e favorecem a ocorrência de estirpes da bactéria resistentes ao cobre que é frequente nas áreas de produção (GRIFFIN et al., 2017). Neste contexto, podemos ressaltar a importância e aplicabilidade dessa pesquisa sobretudo por fomentar novas fontes de controle no desenvolvimento de formulados com elicitores e sua eficácia comprovada tendo em vista a utilização desses em condições de campo, avaliando-se também os aspectos que abrangem a tecnologia de aplicação.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE DIFERENTES MODOS DE APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO E NO CONTROLE DO OÍDIO DO TOMATEIRO

1.1 INTRODUÇÃO

Os lipopolissacarídeos (LPS) são constituintes integrais e essenciais das membranas externas de bactérias Gram-negativas que têm sido extensivamente investigados na ativação das respostas de defesa das plantas (CHÁVEZ-HERRERA et al. 2018). Os lipopolissacarídeos são compostos de superfície celular de bactérias Gram-negativas que estão associados com a membrana externa do envelope celular (RIETSCHEL et al. 1994). A primeira linha de defesa é desencadeada pelo reconhecimento de epítomos microbianos invariantes conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) para o reconhecimento de patógenos potenciais por meio sistema de defesa das plantas (TORRES, 2010).

Nos PAMPs, várias enzimas estão relacionadas ao aumento das atividades enzimáticas de defesa da planta, como quitinase, α -1,3-glucanase, peroxidase (PO), polifenoloxidase (PPO), fenilalanina amônia-liase (PAL), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoxigenase (LOX) (FATHI et al. 2018). As polifenoloxidases (PPOs) são induzidas em resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas e têm sido implicadas em vários processos funcionais, incluindo defesa da planta e envolvendo a via dos fenilpropanóides (ZHANG e SUN, 2021). Os PPOs catalisam a oxidação de fenóis em o-quinonas altamente reativas, após as quais reações secundárias não enzimáticas resultam na formação de polímeros de melanina e polímeros reticulados com grupos funcionais de proteínas (MISHRA e GAUTHAM, 2016).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) é uma enzima relacionada à via dos fenilpropanóides para a biossíntese do ácido salicílico (AS) (LI et al. 2019). Enzima chave que catalisa a transformação da fenilalanina em ácido transcinâmico. O ácido cinâmico é a molécula central para a síntese de fenólicos, que estão envolvidos em reações de defesa, seja como barreiras físicas e químicas ou atuando como moléculas sinalizadoras (KRÖNER et al., 2011).

A aplicação de agentes externos, como compostos estruturais bacterianos, principalmente LPS, também são capazes de “ativar” mais rapidamente genes que direcionam enzimas relacionadas à defesa da planta e alterações no metabolismo celular dentre estes podemos destacar genes relacionados à fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) (UMESHA, 2006).

Tecnologias de aplicação e análise de impactos agronômicos da aplicação de produtos agrícolas são essenciais para maximizar a eficiência no manejo agrícola. Testes sobre quando, como e onde aplicar os produtos podem melhorar o desempenho agrícola. A eficácia dos inoculantes microbianos (seja com o próprio microrganismo ou com compostos celulares) para pulverização foliar depende da dosagem, do modo de ação, estudos dos aspectos de distribuição uniforme da pulverização na superfície do alvo (PREININGER et al., 2018) e o número de aplicações a serem usadas.

Neste estudo, o objetivo foi investigar a capacidade do extrato bruto de LPS em reduzir a severidade da mancha bacteriana e oídio em tomateiro, realizando-se estudos de expressão gênica, tecnologias de aplicação envolvendo número de aplicações e análise da produtividade do tomateiro em cultivo protegido.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 A cultura do tomateiro, mancha bacteriana e o oídio do tomateiro

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é originária da região andina da América do Sul, introduzidas pelos espanhóis na Europa no século XVI. (HARVEY et al., 2002). O tomate é um dos vegetais mais importantes do mundo (ADHIKARI et. al, 2020), presentes em todas as regiões do planeta com 62,6% e 13,1% da produção nos continentes asiático e americano, respectivamente. Os principais países produtores são China com cerca de 64,77 milhões de toneladas, Índia com 20,57 milhões de toneladas, e Turquia com 13,20 milhões de toneladas no ano de 2020 (1º, 2º e 3º maiores produtores, respectivamente). Já o Brasil ocupa a 10º posição no ranking mundial com cerca de 3,75 milhões de toneladas (FAO, 2022).

O Estado de São Paulo está entre os maiores produtores do fruto, sendo dividido por sua destinação, produção para indústria ou para o consumo em mesa. Segundo dados da secretaria de agricultura e abastecimento e o Instituto de Economia Agrícola (IEA) de São Paulo em 2018 foram produzidos para mesa 27.367, 50 caixas de 25 kg e 254.759 t para indústria.

A modalidade de cultivo é direcionada pelas características de arquitetura da variedade escolhida. As variedades de crescimento indeterminado são destinadas a produção de frutos de mesa, cujas plantas são tutoradas e podadas, com o caule podendo atingir mais de 2,5 m de altura. Já as variedades de hábito de crescimento determinado são destinadas ao processamento industrial, adaptadas ao sistema de cultivo rasteiro (FILGUEIRA, 2003).

Em todos os anos a produção de tomate no mundo sofre com inúmeros problemas, por diferentes fitopatogénos, sejam eles bactérias, fungos e vírus (ADHIKARI et. al, 2020). A mancha bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas* spp., é uma das principais ameaças à produção de tomate que afeta tanto o tomate de mesa quanto o tomate industrial (POTNIS et al., 2015). Dependendo do estágio de infecção e das condições climáticas favoráveis, a doença pode causar perdas de produtividade de até 66% (HORVATH et al., 2012). Os sintomas da mancha bacteriana do tomateiro incluem lesões amareladas que evoluem para necroses

nas folhas e frutos, podendo causar desfolha, contribuindo para a redução da produção de frutos comercializáveis. (VALLAD et al., 2010).

O gênero *Xanthomonas* representa um grupo diversificado de bactérias Gram-negativas, incluindo muitas espécies que afetam o pimentão (*Capsicum annuum*) — *Xanthomonas vesicatoria* (NEWMAN et al., 2000), algumas cultivares cítricas — *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (STEFFENS et al., 2017) e tomate que é frequentemente afetado por diversos fatores bióticos (fitopatógenos) devido ao clima tropical quente e úmido do Brasil. A mancha bacteriana do tomateiro é causada por quatro espécies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria* pv. *perforans*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* e *X. vesicatoria*) (QIAO et al., 2020).

A mancha bacteriana causada por *X. perforans* foi inicialmente descrita como sendo causada por uma única espécie, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, com quatro raças distintas, T1, T2, T3 e T4 (STALL et al. 2009). Contudo, novos estudos moleculares propuseram a alteração da nomenclatura de *X. perforans* para *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (ABRAHAMIAN et al., 2021).

Na disseminação do patógeno, as sementes são cruciais para o desenvolvimento da epidemia, já que as sementes podem servir como uma fonte de inóculo. Um ambiente ideal para o desenvolvimento da doença está presente nos setores de produção de mudas, pois altas umidades relativas, seguidas de altas temperaturas e alta densidade de plantas ocasionam alta intensidade da doença (POHRONEZNY et al., 1992). *Xanthomonas* spp. também podem sobreviver epifiticamente na filosfera do tomateiro. É importante ressaltar que as existem populações epífitas de *Xanthomonas* que podem ser residentes nas condições desfavoráveis (MCGUIRE et al., 1991), além de populações capazes de sobreviver em restos culturas por quase 2 anos em regiões de climas temperados e por alguns meses em regiões com altas temperaturas e umidade nas regiões tropicais (JONES et al., 1986).

O manejo da mancha bacteriana do tomateiro, inicialmente era utilizado por antibióticos, ao longo do tempo foram selecionando populações e indivíduos resistentes ao seu uso contra a *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (THAYER e STALL 1962). Outro método químico muito utilizado é a aplicação foliar contínua de cobre, porém as populações de cepas de *Xanthomonas* resistentes aos antibióticos e ao cobre rapidamente se sobressaem devido ao uso frequente (LIAO et al., 2018).

O uso exagerado de cobre e compostos à base de cobre resultou em tolerância muito alta ou populações resistentes entre as populações mundiais de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (KLEIN-GORDON et al., 2021). Por este motivo, métodos alternativos de manejo têm sido explorados para o desenvolvimento de técnicas de controle menos nocivas ao meio ambiente, como acibenzolar-S-metil (ASM) que é capaz de reduzir a severidade da mancha bacteriana do tomateiro (ABRAHAMIAN et al., 2019a). O produto ASM é um composto sintético capaz de induzir resistência adquirida sistêmica (SAR) contra uma ampla gama de patógenos (VALLAD e GOODMAN 2004). ASM mostrou redução significativa da doença em comparação com sprays à base de cobre (Pontes et al. 2016), além de apresentar uma significativa redução da doença em comparação com aplicações dos produtos convencionais à base de cobre e estreptomicina (Huang et al., 2012). No entanto, foram relatados efeitos adversos do ASM no crescimento e rendimento das plantas (EGEL et al., 2018).

A doença conhecida como oídio é causada por duas espécies de fungo: *Oidium neolycopersici* e *Oidiopsis haplophylli* (teleomorfo = *Leveillula taurica*). Ambas as espécies têm ampla distribuição no Brasil. Essas espécies podem causar sérios danos às lavouras de tomate, com perdas estimadas para esse patógeno chegando a 50% da produção (PALTÍ, 1988). Segundo estudos de LAGE et al. (2012), o oídio é favorecido em ambientes secos, com umidade relativa baixa entre 50% e 70% e temperaturas entre 20°C e 25°C (LAGE, 2012). A penetração do patógeno ocorre principalmente pela epiderme ou pelos estômatos, preferencialmente em folhas adultas, desenvolvendo micélio epidérmico e subepidérmico (GLAWE, 2008).

Os sintomas incluem lesões brancas pulverulentas na superfície adaxial das folhas e em todas as outras partes aéreas da planta, exceto nos frutos. É comum em tomates de estufa em todo o mundo, ocorrendo com importância econômica no tomate cultivado em campo.

A supressão do patógeno depende principalmente de fungicidas químicos, porém, a natureza rápida do desenvolvimento epidêmico resulta em frequentes pulverizações onerando esse método de controle (JACOB et al., 2007).

1.2.2 Indução de resistência aspectos gerais

As plantas de modo geral possuem mecanismos intrínsecos de defesa que conferem a elas fatores de resistência ou não. E sabe-se que a condição de doença é uma exceção (AGRIOS, 1997). Porém, por diversos fatores, as respostas de resistência genética são muitas vezes suplantadas pelos patógenos. Pascholati et al., (2005) afirmaram que os vegetais possuem outros mecanismos de defesa que são ainda mais eficientes, mas precisam de um agente elicitador para expressar a resistência. Em outro trabalho de Pascholati et al. (2015), afirmaram que a ativação das respostas de defesa das plantas inicia pelo reconhecimento dos elicitores ou do patógeno propriamente dito como fonte principal dessa interação de reconhecimento.

O processo é desencadeado após a exposição a um sinal externo, que é conectado a receptores nas células vegetais, ativando assim a expressão de genes específicos relacionados a defesa vegetal, que determina a compatibilidade das interações planta-patógeno (BARROS et al., 2010). No reconhecimento dos patógenos, as plantas respondem à sua presença através dos conhecidos PAMPS - Padrões moleculares associados a patógenos ou ainda efetores de patógenos (JONES e DANGL, 2006). A base da indução de resistência em plantas, ocasionada pelo reconhecimento do patógeno ou moléculas eliciadoras que podem ser divididos em resistência sistêmica induzida (ISR) ou resistência sistêmica adquirida (SAR). Sendo que a SAR em plantas possui um caminho de sinalização de defesa específica que ocorre sistemicamente depois de uma exposição localizada, sejam eles patógenos, tratamentos com compostos sintéticos ou naturais (HAMMERSCHMIDT, 2009).

As rotas do ácido salicílico seguem o padrão dos compostos fenólicos que é dependente da biossíntese de fenilalanina e está é sintetizada a partir da eritrose 4-fosfato e do fosfoenolpiruvato. A fenilalanina é convertida em transcinamato, por meio da ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). Este, por fim, segue as rotas de formação do ácido benzóico que se converte em AS ou a rota do hidroxilado a ácido 2-cumárico que é oxidado a AS (STRACK, 1997).

Esses pontos da indução fundamentados e bem elucidados contribuem para linhas bioestratégicas para o manejo de doenças de plantas. O largo campo de ação e sistemicidade da indução de resistência torna-se uma ferramenta muito importante no

controle biológico de doenças em plantas. É importante salientar as dificuldades em determinadas ocasiões de entender e confirmar a indução propriamente dita, já que não podemos simplesmente afirmar que houve resistência apenas pela mera exposição ao agente eliciador, seja biótico ou abiótico (VAN LOON et al., 1998).

Steiner e Schonbeck (1995) para resolver isso propuseram critérios básicos para investigar se a resistência foi proveniente do agente indutor ou ocorreu outros fatores no controle biológico como o controle direto, ou até agindo de formas conjuntas. Abaixo podemos elucidar melhor cada critério e verificarse os pontos apresentados são de fato efetivos, visto que podemos observar várias dificuldades olhando-os isoladamente. Os critérios são: ausência de toxicidade, intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor, inespecificidade da proteção, resistência local e sistêmica. Para indução é interessante a separação espacial do local de aplicação do agente eliciador e o patógeno alvo, pois quando ambos estão situados no mesmo sítio, como ocorre com fungo habitante de solo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* que causa fusariose na pimenta do reino e ação de rizobactérias estimuladoras fica difícil compartimentalizar e realizar os estudos para confirmar tal indução. A não ser que seja aplicada técnicas bem específicas de fendilhamento do sistema radicular expondo metade a metade de agente indutor e do patógeno (ZHOU e PAULITZ, 1994).

Hammerschmidt e Kuc (1995) citam que se pode decorrer de um dia até uma semana para que a resistência se expresse. Outra questão levantada é que, se existe expressão gênica na indução e o silenciamento desses genes não interfere na resistência, é provável que esta seja ocasionada por outros fatores. Outro aspecto que deve ser observado é que se o indutor é biótico, há necessidade de uma quantidade mínima de células em contato com a planta para haver indução e o aumento das células do indutor após a indução não está ligada ao aumento de resistência (RAAIJMAKERS, 1995).

Um dos fatores mais importante na resposta de defesa induzida é sua ação inespecífica, pois segundo Hoffland et al. (1996), existe uma proteção generalizada para uma gama de patógenos, ou seja, uma vez considerado indutor de resistência (especialmente para agentes bióticos), ele poderá ter sua ação efetiva para várias espécies, diferentes gêneros e até reinos, levando em consideração a ação múltipla em fungos, bactérias e insetos.

De forma didática, podemos distinguir os eliciadores quanto a sua origem, como

bióticos ou abióticos. Porém, tais categorias podem vir a se sobrepor em momentos de síntese das substâncias biológicas. Os abióticos podem ser: luz ultravioleta, íons metálicos e moléculas orgânicas sintetizadas como, por exemplo, o ASM (acibenzolar-S-metil) (PASCHOLATI e LEITE, 1994). Quanto aos bióticos, podemos destacar aqueles produzidos e disponibilizados pelos patógenos ou pela planta. Como exemplo temos os fragmentos de parede celular provenientes dos patógenos ou dos vegetais. Podemos citar dentre eles as glicoproteínas, oligopeptídeos, carboidratos, lipopolissacarídeos (LPS's) e ácidos graxos (HAHN, 1996). Na revisão de SIAH et al. (2018) podemos verificar vários exemplos e estudos relacionados com as principais fontes de elicitores ou agente indutores de resistência em plantas.

Os receptores abrangem moléculas do sistema de reconhecimento do hospedeiro. Estes mediam a ativação de respostas de defesa em plantas, independentemente da cultivar. Esses receptores são norteados, por vários genes quinases (RLKs) e de proteínas receptoras (RLPs) nos genomas de plantas. (HE et al., 2007). A transdução de sinais consiste na transmissão e as respostas iniciais nas células vegetais ocorrem após uma interação com o agente eliciador alterando o potencial transmembrânico e a alcalinização extracelular (NÜRBERGER et al., 1994).

A alcalinização extracelular provoca a despolarização da membrana (BLUME et al., 2000). A elevação da concentração de Ca^{2+} no citoplasma pode desencadear muitos sinais que estimulam atividade dos canais de cálcio (HETHERINGTON e BROWNLEE, 2004).

Seguindo a lógica de ação, a percepção e a transdução de sinais, irão finalizar com a expressão de genes de defesa dos tecidos da planta. Esta etapa, portanto, consiste na conversão de sinal em respostas específicas, tais como a ativação dos “sinais de alerta” da incidência de patógenos: o etileno, ácido jasmônico e seus derivados, e por fim ácido salicílico. Todos esses são denominados reguladores da defesa vegetal. As rotas de sinalização se intercalam, fornecendo às plantas um grande potencial de regulação (RESENDE, 2013).

1.2.3 Fatores bióticos na indução de resistência

Dentre os fatores bióticos que induzem resistência podemos citar os compostos químicos liberados por microorganismos, biofertilizantes, bactérias fluorescentes e algumas espécies de fungos não patogênicos como no caso do gênero *Trichoderma*

spp. e algumas estirpes de *Pseudomonas* spp., estão entre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) que causam redução da intensidade de doenças (RAAIJMAKERS; WELLER, 1998).

No caso dos biofertilizantes, por serem ricos em diversidade biológica de microorganismos, sua atividade bioativa é alta provocando os mecanismos sejam de SAR como de ISR. Isso acontece sobretudo pelos estímulos transportados por mediadores químicos que incidem sobre os sítios fitoreceptores, produzindo reações de defesas nos mais distantes tecidos vegetais (BARBOSA e MEDEIROS, 2007).

1.2.4 Fatores abióticos na indução de resistência

A descoberta de agentes não-biológicos como indutor de resistência veio primeiramente com o próprio ácido salicílico, utilizado com boa efetividade contra *Phytophthora palmivora* em cacaueteiro (OKEY e SREENIVASAN, 1996). Áreas lesionadas tanto na parte aérea como na região inferior da planta e até sementes foram reduzidas com a aplicação do hormônio vegetal em questão. Em níveis bioquímicos, os produtos sintetizados em laboratório a partir do hormônio são caracterizados como ativadores de resistência em plantas. Como é o caso do Acibenzolar-S-metil (ASM) que pertencem ao grupo dos benzotiadiazoles (BTH), apresentando baixa toxidez a patógenos de plantas (MORAES, 1998).

1.2.5 Padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs

A primeira linha de defesa é desencadeada pelo reconhecimento de epítomos microbianos invariantes conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) para o reconhecimento de patógenos potenciais no sistema imunológico inata a das plantas (TORRES, 2010), através de receptores de reconhecimento de padrões localizados na superfície celular (PRRs) para ativar a imunidade desencadeada por PAMPs.

Por outro lado, os efetores de patógenos são detectados por repetição rica em leucina de ligação de nucleotídeo em espiral enrolada intracelular (CC-NLR, CNL) e repetição rica em leucina de ligação de nucleotídeo do receptor Toll/interleucina⁻¹(TIR-NLR, TNL), desencadeando imunidade por efetores (ETI) (CHANG et al.,2022).

Durante as interações planta/patógeno incompatíveis, as reações de defesa do hospedeiro são iniciadas após a percepção de sinais "não próprios" do patógeno denominados pelos receptores transmembrânicos da planta denominados "receptores de reconhecimento de padrão" (BOUBAKRI, 2020). O reconhecimento de PAMPs inicia uma cascata de transdução de sinal envolvendo a ativação de MAPquinasas, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mudanças na expressão gênica (LEE et al., 2018).

PAMPs representam estruturas que são essenciais para a vida microbiana e que são inatas a patógenos. Estes incluem constituintes da superfície celular, mas também podem ser enzimas ou proteínas secretadas normalmente localizadas no citoplasma. Uma ampla gama de PAMPs estruturalmente diversos foi descrita originando-se de patógenos fúngicos, oomicetos e bacterianos (HENRY et al., 2016).

PAMPs de lipopolissacarídeos, por exemplo, podem induzir respostas de defesa vegetal relacionadas a resistência sistêmica adquirida (SAR) (MISHINA et al., 2007). A SAR pode induzir resistência específica e inespecífica a patógenos através da interação de produtos gênicos de resistência de plantas (R), produtos gênicos avirulentos e produtos derivados da interação planta- patógeno de uma maneira geral, tais como: moléculas compostas por oligossacarídeos, peptídeos, lipídios e proteínas. localizados na superfície celular (NADARAJAH et al, 2009).

Os elicitores em patógenos podem ser divididos em duas categorias: elicitores gerais e elicitores específicos. Os elicitores gerais estão envolvidos nas vias gerais de sinalização de resistência, enquanto os elicitores específicos estão mais relacionados com a sinalização mediada pelos genes R. Os elicitores que são capazes de desencadear a defesa em plantas não hospedeiras e hospedeiras através da presença percebida de patógenos. A maioria dos elicitores gerais está essencialmente presente nas paredes celulares do patógeno como componentes estruturais, por exemplo, glucano, quitina, flagelina e lipopolissacarídeo (LPS) (MALIK et al., 2020).

1.2.6 Lipopolissacarídeos

Lipopolissacarídeos são compostos presentes, principalmente, na membrana externa de espécies de bactérias Gram-negativas. A sua arquitetura é conservada e compreende três principais domínios: uma membrana lipídica, um núcleo oligossacarídeo e geralmente O-polissacarídeos mais externo, que projeta a superfície celular (RANF e KUTSCHERA, 2019). A estrutura do LPS pode ser considerada um PAMP, quando é constituinte estrutural de microorganismos patogênicos, reconhecido prontamente pelo sistema de defesa vegetal (RANF e KUTSCHERA, 2019).

Os LPS de várias fontes bacterianas desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio em plantas de tabaco, em ensaios modelos de plantas com *Arabidopsis*, e folhas de pimenta mobilizando várias outras respostas de defesa vegetal após infecções por patógenos (MISHINA et al., 2007). Essas respostas de defesa vegetal, após o reconhecimento de lipopolissacarídeos podem ser explicitadas com estudos de Andersen et al. (2018), ao qual relaciona em sua revisão o fechamento dos estômatos após o reconhecimento de moléculas de LPS induzidas por vias de sinalização AS e ácido abscísico (ABA) para impedir a entrada de patógenos.

Vários estudos têm investigado a ação dessas moléculas e a importância que cada componente dos LPSs no processo de reconhecimento. Por exemplo, Silipo et al. (2005) descreveram a capacidade de um lipídio A e oligossacarídeos centrais derivados do lipooligossacarídeo das *Xanthomonas campestris* de induzir a expressão dos genes importantes (PR1 e PR2) em *Arabidopsis* na prevenção a reação de hipersensibilidade (HR) induzida por uma bactéria virulenta. No entanto, LPSs podem envolver principalmente influxo de Ca_2^+ , alcalização do meio extracelular, geração de ROS, deposição de calose, biossíntese de fitoalexina e expressão de genes relacionados a defesa vegetal (BOUBAKRI, 2020).

1.2.7 Polifenoloxidasas (PPO) e fenilalanina amônia-liase (PAL)

As respostas de defesa do hospedeiro começam no sítio de infecção e subsequentemente se estendem para as células vizinhas, ativando sistemicamente o sinal de defesa vegetal e levando à resistência sistêmica adquirida (SAR) (WALTER e FOUNTAINE, 2009).

Os compostos fenólicos no pool metabólico da planta são muito influenciados pelo tratamento com diferentes elicitores, que eventualmente resultam em aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) (NAFIE e MAZEN, 2008).

A PAL é uma importante enzima da via dos fenilpropanóides envolvida na biossíntese de compostos fenólicos e da molécula sinalizadora AS (LAVANYA et al., 2022). A PAL leva à produção de muitas fitoalexinas ou compostos reativos durante o desenvolvimento das reações de hipersensibilidade após tratamento com vários elicitores e proteínas relacionadas a patogênese (PRs). Essas desempenham um papel importante na defesa da planta contra infecções patogênicas e ativa mecanismos de sinalização junto com respostas celulares através de cascatas de proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK) (CASABUONO et al., 2010).

Nos estudos de CASABUONO et al. (2010) foi verificada alta atividade de enzimas relacionadas a defesa vegetal, como a PAL, que registrou no trabalho plântulas com e sem tratamento de elicitores a base lipopolissacarídeos, uma grande atividade após a aplicação do agente elicitor mais a inoculação do patógeno em questão. Os picos atingidos foram registrados 9h após inoculação.

A interação do patógeno e os hospedeiros induzem algumas mudanças no metabolismo celular, primeiramente nas atividades enzimáticas, peroxidase (POX) e a polifenoloxidase (PPO) (UMESHA, 2006). Essas enzimas são importantes nos processos biossintéticos relacionados à parede celular como lignificação, polimerização de glicoproteínas e alongamento de parede celular (BELKHADIR et al., 2004).

A PPO é uma enzima relacionada com os processos oxidativos de vários compostos fenólicos. Segundo Campos e Silveira (2003), a enzima PPO é responsável pela formação de quinonas que têm de ação antimicrobiana. A ação da enzima PPO ocorre com características desejáveis para planta, em situações específicas, pois é capaz de oxidar os compostos fenólicos reduzindo a ação tóxica

desses compostos na planta, mas mantendo as características de contenção dos microorganismos patogênicos.

1.2.8 Análise de expressão gênica através de PCR em tempo real

O controle alternativo de doenças de plantas pode ser desencadeado pela eliciação de resposta de resistência anteriormente à infecção pelo patógeno, pois os mecanismos de defesa são controlados geneticamente e dependem da expressão dos mesmos no momento correto após contato entre patógeno e o hospedeiro (LOUWS, 2001). Dependendo do elicitador, um incremento indireto na produtividade do tomateiro pode chegar até 100% como descrito por Louws et al. (2001).

Para avaliar a expressão de genes relativos à indução de resistência são aplicadas tecnologias moleculares tais como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e a qPCR ou PCR em tempo real, que nada mais é que uma evolução da metodologia do PCR comum. Na qPCR pode ser utilizado diversos tipos de fluoróforos tais como o TaqMan (sondas ligadas a primers) ou SYBR Green (fluoróforo ligante a fitas duplas do DNA) que é o mais utilizado por sua maior sensibilidade no uso e baixo custo. Porém essa sua ligação em todo DNA fita dupla surge durante o processo da reação ligando-se a produtos inespecíficos, (NOVAES e PIRES-ALVES, 2004).

A quantidade de amplificados na fase exponencial que é proporcional a quantidade de DNA/cDNA inicial alvo. Todas as análises são usualmente baseadas na possibilidade de que todas as amostras analisadas possuem eficiências similares para um produto específico, desde que o mesmo gene seja analisado em cada amostra, com o uso dos *primers* específicos selecionados anteriormente (LIU e SAINT, 2002). Para filtragem de erros de metodologias, é possível analisar e corrigir a eficiência através de softwares específicos, tais como: o LinRegPCR, que utiliza análise de regressão linear para calcular a eficiência baseada nas concentrações iniciais de mRNA para cada amostra (ANA, 2012).

A utilização em conjunto da metodologia experimental de Real Time PCR com técnicas e programas computacionais de correção de desvios nas análises garante a confiabilidade da tecnologia de medição da expressão de genes.

1.2.9 Tecnologia de aplicação

Na agricultura, uma das principais ferramentas fitossanitárias é a tecnologia de aplicação, uma área multidisciplinar de suporte ao controle de insetos, plantas não desejáveis no cultivo e sobretudo agentes fitopatogênicos (FERREIRA, 2006). As tecnologias de aplicação em si levam em consideração aspectos biológicos, químicos, de engenharia, ecológicos, sociais e econômicos (FERREIRA, 2006). Estudos relacionados a tecnologia de aplicação são essenciais para o manejo fitossanitário assertivo. (MATUO, 1990). Contudo, para que o defensivo agrícola promova o resultado esperado, é importante a deposição do produto em todas as partes alvos da planta, o que nem sempre acontece por falta de cuidados na hora de utilizá-los, seja pela ausência de maquinário adequado ou por problemas ambientais. E diante disso as soluções dos produtores normalmente estão ligadas ao aumento do número de pulverizações, aumentando também o custo de produção (BAESSO et al., 2009).

Os processos de aplicação de agrotóxicos ou produtos agropecuários, normalmente ocorrem por fragmentação dos líquidos para pulverização. Todo esse processo pode ocorrer de acordo com as características do produto, do volume de calda a ser utilizado, as pontas de pulverizações adequadas, pressão de operação e as condições ambientais (PROKOP e VEVERKA, 2006).

Assim, problemas na aplicação de produtos têm sido registrados e são essenciais para assertividade nas aplicações de quaisquer produtos fitossanitários. Um aspecto muito importante a ser observado, por exemplo, pode ser encontrado nos estudos de Chaim et al. (1999c) observaram uma grande variação da eficiência de aplicação de produtos, bem como sua deposição nas folhas das plantas, foi dependente do porte da planta, com perdas variando de 49 a 88% no feijoeiro, e 44 a 71% na cultura do tomate. Inúmeras pesquisas estão buscando melhorias na eficiência de aplicação de agrotóxicos tanto para aumentar a deposição nos alvos quanto diminuir a contaminação ambiental.

As pesquisas desenvolvidas por Chaim (1984) desenvolveram modificações em pulverizadores manuais comuns com pontas cônicas vazias, com uma ação de eletrodinâmica, ou seja, com fontes eletrostáticas ativas inseridas no equipamento de pulverização manual comum.

No Brasil foram desenvolvidos equipamentos tratorizados e motorizados costais com essa ação eletrodepositora pneumática, com ensaios de campo reduzindo em

até 5 vezes a dose de ingredientes ativos nas eficiências de controle (CHAIM et al., 1998; CHAIM, et al., 1999; CHAIM et al, 2002; COFFE, 1981; ARAUJO et al., 2002) em relação a pulverização convencional.

Para as caldas aplicadas com ação de indução eletrostática ou condutividade elétrica, são necessárias cargas indiretas no processo de indução, mantendo o eletrodo na zona de formação de gotas (CHAIM et al., 2002). Para que isso ocorra de maneira efetiva é utilizado ar com altas pressões em altas velocidades para manter o eletrodo seco (CHAIM, 1998; CHAIM, LARANJEIRO e CAPALBO, 1999; CHAIM, PESSOA e FERRACINI, 2002).

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Aspectos gerais

Os ensaios foram conduzidos em duas etapas: A primeira etapa foi direcionada ao teste de dosagem para ajustar a resposta mais adequada à redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro e índices SPAD utilizando o Medidor de Clorofila, Modelo SPAD-502 Plus (Konica Minolta). Nesses ensaios, as plantas de tomateiro (cultivar santa clara) foram cultivadas em vasos de 0,5 L com substrato à base de uma mistura de argila, areia e matéria orgânica na proporção de 1:1:1. O método de irrigação utilizado foi de gotejamento com acionamento 4 vezes ao dia (8h, 11h, 14h e às 17 h).

A correção da acidez potencial foi realizada a cada 30 L de solo peneirado seguindo interpretação da análise de solo realizada pelo Laboratório de Qualidade do Solo - LQS pertencente à Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Unidade de Meio Ambiente), localizado no município de Jaguariúna, SP, seguindo o método de extração Mehlich (SCHONINGER et al. 2012).

A recomendação nutricional recomendada foi realizada para cada 30 L de solo após a interpretação da análise do solo. A base teórica complementar para o cálculo da fertilização foi extraída de Raij et al. (1997). A adubação inicial foi realizada nas plantas com a fórmula NPK 8-28-16 e complementada com cobertura por fertirrigação no final do ciclo vegetativo e no período de formação dos frutos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental, Laboratório de Genômica e respectivas estufas da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

As colônias utilizadas em todos os ensaios deste trabalho foram cultivadas em meio 523 Kado & Heskett a 28 °C / 24 h. Para inoculação na planta, uma cultura de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* foi cultivada por 24 h a 28°C. Em seguida, as células bacterianas foram centrifugadas por 10.000 g por 20 min, depois suspensas em água destilada estéril até uma concentração final de $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

A seleção, o isolamento das bactérias e a avaliação da capacidade elicitora de compostos estruturais de espécies não compatíveis com o tomateiro, foram previamente estudados por meio de experimentos conduzidos por Simões et al. (2021).

1.3.2 Obtenção de lipopolissacarídeos (LPS)

A metodologia de extração dos extratos brutos de lipopolissacarídeos foi realizada conforme Simões et. al (2021). As culturas de *Xanthomonas* foram cultivadas por 48 h em meio 523 (KADO e HESKETT, 1970) a 27 °C e as células bacterianas suspensas em tampão fosfato (10mM, pH 7,2), ajustadas para concentração $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, centrifugadas (4000 g, 5 min) e liofilizadas.

Posteriormente, 100 mg do produto obtido foram ressuspensos em 10 ml de tampão composto por 50 mM Tris/HCl e 2 mM EDTA (pH 8,5), seguido de banho de ultrassom por 6 períodos de 15 s a 4 °C. A suspensão foi centrifugada (600 g, 20 min) para remover as células intactas e o sobrenadante foi novamente centrifugado (8000 g, 60 min) para obter o LPS como pellet, mantido a -20 °C até o momento do uso (MEZIANE et al., 2005). Todo esse processo de extração pode ser revisado nos arquivos em anexos de passo a passo escrito e ilustrado de obtenção do extrato bruto de LPS (arquivos suplementares 5 e 6).

1.3.3 Teste de concentrações com LPS para ajustes de concentrações

Os testes para ajuste de concentração foram realizados em condições controladas com delineamento inteiramente casualizado em esquema simples com 1 indutor LPS pré-selecionado oriundo da coleção de microrganismos de importância agrícola e Ambiental da Embrapa Meio Ambiente – CMAA (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* – XP-SP, código 1829) e com base nos estudos anteriores do grupo de pesquisa de espécie de *Xanthomonas* sp. incompatível (SIMÕES et al., 2021) x 4

concentrações x 10 repetições. As concentrações testadas foram 10,6, 5,3, 2,65 e 1,3 µg/ml. As avaliações foram realizadas estimando-se a severidade da doença por meio da escala diagramática descrita por Mello et al. (1997) aos 7, 9, 12, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno. O modelo de regressão foi testado e foram utilizados os testes de suposições para a validade do modelo de regressão polinomial disponível no pacote de software R (2021).

As medições do teor de clorofila foram realizadas por meio do Clorofilômetro (Modelo SPAD-502 Plus Konica Minolta), no mesmo período de avaliação da severidade, portanto com cinco dias de leituras. As leituras foram organizadas nos períodos mais frescos do dia, escolhendo-se o folíolo apical da primeira folha composta expandida abaixo do ápice da planta. Os resultados encontrados foram analisados de acordo com dados quantitativos por unidades ou índices SPAD (MARTÍNEZ et al., 2017), por meio do pacote de software R, comparando médias de tratamento para cada dia de avaliação pelo teste LSD a 5% de significância.

1.3.4 Avaliação de diferentes tecnologias de aplicação e características agronômicas de plantas expostas ao elicitor e sua eficácia no controle da mancha bacteriana

Os testes de produtividade seguiram as mesmas condições experimentais dos testes anteriores com modificações. A cultura foi irrigada diariamente (4 vezes ao dia) por gotejamento. O desenho experimental dos ensaios seguiu em DIC - inteiramente casualizado em esquema fatorial com 3 fatores: Inoculado com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e não inoculados com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* x três métodos de aplicação - Pulverização com ponta cônica vazia (PCV); Pulverização com ponta cônica vazia + eletrostática (PCVe) e aplicação via solo x três regimes de aplicações (aplicação na fase vegetativa x aplicação no início da floração e aplicação no início da frutificação) com 5 repetições + 2 tratamentos adicionais: aplicação de água e tratamento apenas com aplicação bacteriana.

Os tratamentos via modo de pulverização foram aplicados até o ponto de escorrimento das gotículas nas folhas do tomateiro, e as aplicações via solo foram realizadas próximas ao colo da planta em cerca de 5 mL por vaso do elicitor a base de LPS.

O espaçamento entre plantas foi de 1,0 m entre linhas x 0,8 m entre vasos de 10 L cada. As aplicações dos tratamentos foram realizadas em três momentos de acordo

com o estágio fenológico da cultura, sendo a primeira aplicação iniciada após o início do estágio vegetativo, a segunda no florescimento e a terceira no início da frutificação. Um dia após a primeira aplicação, as plantas foram pulverizadas nas folhas com uma suspensão de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* a $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

A severidade da doença foi estimada por meio de uma escala diagramática por Mello et al. (1997) realizou com um total de 10 leituras, em intervalos de 2 dias até a 5ª leitura (respectivamente: 12 dias, 14, 16, 18 e 20 dias após a inoculação do patógeno). Após esse período, as leituras foram desbalanceadas, acompanhando o avanço do progresso da doença, por conseguinte, foram adicionadas mais 5 leituras aos 23, 25, 32, 35 e 39 dias após a inoculação do patógeno.

Os teores de clorofila foram determinados nas plantas realizando 10 leituras, no mesmo período das avaliações de severidade. Todas as leituras foram feitas com o Medidor de Clorofila, Modelo SPAD-502 Plus, equipamento Konica Minolta para cada tratamento. As leituras foram realizadas sempre no mesmo período da manhã, no folíolo apical da primeira folha composta expandida abaixo do ápice da planta. Os resultados foram analisados usando dados quantitativos representados por unidades SPAD (MARTÍNEZ et al., 2017).

Para os parâmetros de produtividade, os frutos foram analisados pelo peso total de frutos da planta, o número de frutos totais e o número de frutos comerciais, de acordo com a classificação disponível do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1995) que descreve e classifica as características mínimas aceitáveis dos frutos para comercialização.

Para avaliar as interferências no desenvolvimento normal da cultura, também foram analisados alguns parâmetros agrônômicos, como altura das plantas, biomassa da parte aérea, biomassa das raízes e Brix dos frutos colhidos. O Brix foi avaliado por representantes de frutos de cada planta Fruto (1 por cacho), com 3 repetições técnicas realizadas utilizando o refratômetro de Bolso Digital Hand-HELD XDRB0, 0,0-53,0% BRX., modelo XDRB0-53.

A estatística dos fatores agrônômicos para a avaliação foi conforme esquema fatorial indicado, realizando o desdobramento do tratamento, quando aplicável, e conforme os pacotes SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). e software R, comparando as médias de tratamento para cada dia de avaliação pelo teste LSD ($p < 0,05$).

1.3.5 Eficácia do extrato bruto de LPS no controle do oídio do tomateiro

Durante o cultivo do tomateiro, avaliando a resposta do agente elicitor baseado no LPS (XP-SP), especificamente na fase de florescimento do tomateiro, ocorreu uma epidemia de oídio devido às condições ambientais favoráveis, de 30 a 40% de umidade e temperaturas não superiores a 27 °C, registradas com termohigrômetro instalado em casa de vegetação (LAGE, 2012). As avaliações de severidade para o oídio do tomate foram realizadas em 5 datas; 50, 52, 53, 54 e 104 dias após a inoculação de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* que era a análise pré-estabelecida. A intensidade da doença foi avaliada por meio da escala diagramática proposta por Lage (2012).

Todas as análises dos dados agronômicos foram realizadas de forma semelhante às para as respostas à mancha bacteriana em tomateiro, em um delineamento completamente casualizado em esquema fatorial triplo, avaliando cada interação significativa e contraste separadamente, por meio do pacote de software R e do pacote estatístico SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC), comparando o tratamento por Teste de LSD ($p < 0,05$).

1.3.6 Análise em qPCR em tempo real de genes-chaves relacionados ao sistema de defesa vegetal

A partir dos experimentos com ciclo completo de tomate, foram selecionadas 3 réplicas dos melhores tratamentos (tratamentos com menores intensidades da doença e maiores índices de produtividade) para a análise da expressão gênica de ensaios de qPCR em tempo real com genes PAL e PPO relacionados ao sistema antioxidante e codificação associada à defesa vegetal. Os tratamentos foram: aplicação do indutor de LPS apenas, aplicação do indutor de LPS + *X. euvesicatoria* pv. *perforans* + PCVe (modo de aplicação selecionado de experimentos anteriores), aplicação do LPS + *X. euvesicatoria* pv. *perforans* + via solo (método de aplicação selecionado em experimentos anteriores), plantas aplicadas apenas com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e plantas sem aplicação (controle).

As sequências de primers que flanqueiam as regiões dos genes (anexo 1) foram sintetizadas usando o software Primer3 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), e

verificadas quanto à especificidade usando a ferramenta Primer-BLAST no NCBI (National Center for Informações sobre Biotecnologia).

Amostras foliares foram coletadas de cinco tratamentos: aplicação de água, inoculação bacteriana (*X. euvesicatoria* pv. *perforans*), aplicação de LPS, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* + aplicação de LPS com PCVe e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* seguido de aplicação de LPS pelo método via solo. Para cada tratamento, amostras independentes de RNA foram obtidas de um pool de folhas (2 a três folhas) da mesma planta, sendo maceradas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a extração do RNA. As extrações de RNA total do material vegetal foram realizadas pelo método do cloreto de lítio (LiCl), que pode ser ilustrado pelo mini-protocolo elaborado em arquivo complementar 2. Para remover possíveis contaminantes, as amostras foram tratadas com um kit DNase I, RNase-Free (Fermentas Life Sciences) para eliminar qualquer resmanescente de DNA genômico. As amostras de RNA total foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific), e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2%.

Os cDNAs foram usados como modelo de qPCR quantitativo e produzidos usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (ThermoFisher Scientific). A qPCR em tempo real foi realizada utilizando um master mix SYBR Green (Applied Biosystems), seguindo as reações e amplificações de acordo com Lima et al. (2018). Três réplicas biológicas por tratamento foram consideradas para a análise de expressão. O gene PHD foi utilizado como controle endógeno com base nas informações fornecidas no artigo de Müller et al. (2015). As reações foram realizadas em triplicatas e um pool de amostras de RNA da aplicação de água foi utilizado como controle (expressão relativa = 1) para quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). As médias de expressão relativa foram testadas pelo teste LSD ($p < 0,05$).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

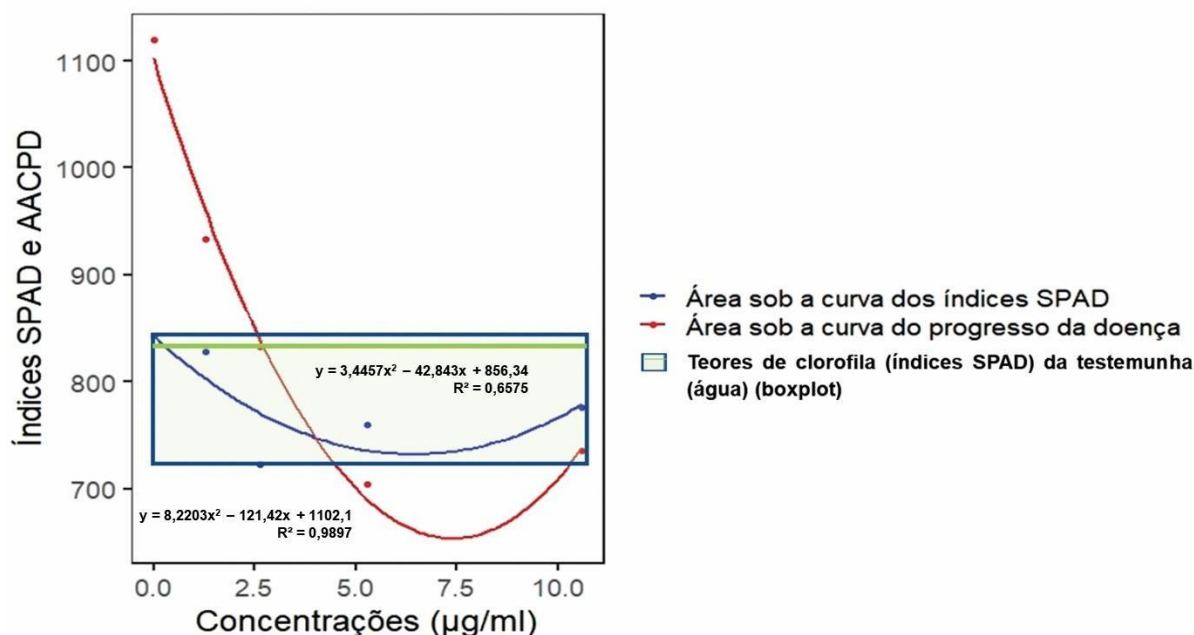
O teste de concentração com LPS bruto para ajustar a concentração para obter o modo de aplicação mais adequado foi analisado a partir da espécie não compatível, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (XP-SP) para verificar sua capacidade de reduzir a severidade da mancha bacteriana em tomateiro, associada à resposta de diferentes tratamentos em termos de clorofila, e o melhor método de aplicação do elicitor.

As diferentes concentrações indicaram pequenas variações nos níveis de clorofila e diminuição nos percentuais de severidade com um ponto de equilíbrio entre o teor de clorofila e a intensidade da doença, estimado na dose de 7,3 µg/ml (Figura 1). Após esse limiar de equilíbrio, os valores de severidade tendem a aumentar. Os valores médios de SPAD permaneceram dentro da faixa lida para os controles (inoculados e não inoculados), o que leva a inferir que os tratamentos com LPS não têm efeito deletério nas plantas. Além disso, não foi encontrada correlação significativa entre a intensidade da doença e os níveis de clorofila (Pearson, $r=0,311$), o que indica não haver evidência de relação entre o efeito negativo da doença no aparelho fotossintético em células não sintomáticas.

Em aspectos gerais, as plantas respondem ao reconhecimento de lipopolissacarídeos, que inclui a regulação da produção de espécies reativas de oxigênio, expressão de proteínas relacionadas à patogênese e acúmulo de ácido salicílico e metabólitos fenólicos (IIZASA et al., 2017). Nesse sentido, algumas observações estudadas neste trabalho nos ajudam a entender os efeitos do LPS em plantas de tomate.

Observa-se que a aplicação de LPS pode regular a morte celular desencadeada pela interação planta-patógeno, sem causar fortes desvios metabólicos até um limiar de equilíbrio (NEWMAN et al., 2000). Essa capacidade de regular as respostas de hipersensibilidade (HR) pode indicar a relação, em baixas concentrações, com o teor de clorofila estatisticamente igual aos controles, o que nos leva a inferir que a supressão do patógeno é mantida em níveis aceitáveis de convivência com plantas sem requerer gasto de energia desnecessário.

Figura 1 – Avaliação do efeito de diferentes concentrações do elicitor LPS (XP-SP) na severidade da mancha bacteriana do tomateiro e nos teores de clorofila das plantas aplicadas. As linhas no gráfico representam a análise de regressão das médias de AACPD e AUCC (Área sob a curva de progresso da doença e Área sob a curva de clorofila), o boxplot representa os teores de clorofila da testemunha aplicada apenas com água



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 2021.

Os resultados considerando parâmetros agronômicos e de produtividade foram realizados analisando-se possíveis interações ou simples efeitos de fatores principais e verificou-se que apenas para o tratamento biomassa seca da folha, houve uma interação fatorial tripla significativa para inoculação x modo de aplicação x regime de aplicação ($p < 0,0312$). O fracionamento da interação foi analisado usando o comando SLICE (Nogueira e Corrente, 2000) no SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). No grupo 1, os tratamentos da área sob a curva e os parâmetros agronômicos de biomassa da raiz (fresca e seca) foram separados de acordo com sua significância exclusivamente para o fator de inoculação. Nesse sentido, as médias foram compiladas para cada variável resposta e comparadas apenas entre os fatores inoculados e não inoculados, conforme apresentado na Tabela 1.

No grupo 2, os dados dos parâmetros de produtividade foram agrupados, observando-se significância entre os modos de aplicação do elicitor e os tratamentos inoculados. Na tabela 2 podemos ver os dados dos tratamentos não inoculados e

inoculados com diferença estatística apenas para as plantas tratadas com elicitor e inoculadas com o patógeno. O fator altura foi analisado separadamente quanto aos seus níveis de significância entre a altura das plantas inoculadas e o número de aplicações. As plantas não inoculadas não apresentaram diferenças significativas no número de aplicações.

O fator biomassa fresca da parte aérea foi o único que não obteve diferença significativa já no teste F, indicando que todos os tratamentos foram iguais entre si para este fator. Neste agrupamento 1, apresentado na tabela 1, podemos verificar globalmente a forte interferência da aplicação ou não de LPS de forma preventiva à inoculação do patógeno. Após a inoculação do patógeno com aplicação prévia de LPS, pode-se alterar a fisiologia da planta, redirecionando os recursos energéticos para a defesa da planta.

Custos de alocação direta, que são recursos alocados para resistência ao invés de crescimento e reprodução, e custos ecológicos que ocorrem após o resultado da mudança da fisiologia da planta afetando as interações com fatores ambientais (VOS et al., 2013), podem ocorrer. Observa-se que os parâmetros de biomassa foram todos reduzidos quando comparados com os tratamentos não inoculados, indicando forte interferência da doença no desenvolvimento da planta e caracterizando a associação doença + recursos direcionados à defesa da planta como custos de alocação.

Os níveis de clorofila (AUCC) também foram alterados para plantas expostas ao LPS e ao patógeno, observando os custos de alocação, ou seja, possivelmente alterando a interação à capacidade fotossintética das plantas. Nesse contexto, discussões posteriores neste trabalho sugerem e elucidam melhor essa interferência fotossintética, pois os resultados com análises diferenciais de genes relacionados à defesa indicaram alta atividade da enzima fenilalanina amônia liase. Esta enzima está diretamente relacionada com a produção de ácido salicílico (AS) que, entre outras alterações fisiológicas, espiração e fotossíntese são fortemente influenciadas pelo AS (RIVAS-SAN VICENTE e PLASENCIA, 2011). Além disso, as células-guarda estomáticas, reconhecendo os padrões moleculares conhecidos associados a patógenos bacterianos (PAMPs), como os lipopolissacarídeos, podem induzir o fechamento estomático via sinalização SA e ABA para impedir a entrada do agente agressor (ANDERSEN et al., 2018).

Tabela 1 – Análise de parâmetros agronômicos em resposta à inoculação ou não de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e aplicação do agente elicitor LPS

Tratamentos	Parâmetros agronômicos		
	AUCC	Biomassa	
		Fresca da raiz	Seca da raiz*
Inoculado	935,65 A	2,84 A	1,60 A
Não inoculado	953,93 B	3,32 B	1,96 B

As médias das diferenças são entre linhas, inoculado vs não inoculado com diferença estatística por letras diferentes entre os tratamentos: AUCC = Área sob a curva do teor de clorofila (SPAD), biomassa fresca e seca da raiz. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). *Dados transformados em raiz quadrada.

Na Tabela 2, os parâmetros de produtividade foram analisados de acordo com cada modo de aplicação conforme os tratamentos inoculados e não inoculados. Para este grupo 2 de tratamentos, a regime de aplicação não apresentou diferenças significativas. Plantas inoculadas e tratadas com LPS por meio de aplicação eletrostática PCVe apresentaram menor PTF (peso total de frutos), enquanto que por aplicação por PCV, maior PTF. Quando as plantas não foram inoculadas, o PTF foi o mesmo para todos os modos de aplicação, independentemente se aplicadas ou não com LPS.

Na aplicação no solo, as plantas inoculadas apresentaram maior PTF. Para NFC (número de frutos comerciais), no entanto, a aplicação por PCV em plantas com doença (inoculadas) resultou em NFC menor. O teor de Brix, independentemente do modo de aplicação não se alterou, porém dentro do PCV, o brix foi maior para plantas não inoculadas.

Tabela 2 – Análise dos parâmetros de produtividade em respota à inoculação ou não de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e aplicação do agente elicitor LPS

Tratamentos	PTF		NFC		BRIX	
	NI	I	NI	I	NI	I
PCVe	29,04 Aa	25,47 Ba	2,73 Aa	3,06 Aa	4,16 Aa	4,16 Aa
PCV	24,57 Aa	31,34 Aa	2,17 Aa	2,62 Ba	4,29 Aa	3,93 Ab
Solo	23,81 Ab	28,94 ABa	2,31 Ab	2,81ABa	4,21 Aa	3,94 Aa

PTF = Peso total do fruto; NFC = Número de frutos comerciais; Brix = teor de Brix (sólidos totais), PCVe = cone vazio + modo de aplicação eletrostática. As análises estatísticas foram separadas em Não inoculado (NI) e inoculado (I), sendo as médias comparadas entre as linhas dentro de cada grupo (inoculado ou não inoculado) nos três diferentes modos de aplicação. Letras maiúsculas representam contrastes no sentido da coluna e minúsculas no sentido da linha. Um teste de LSD médio foi realizado para comparar os tratamentos a 5% de probabilidade. *Todos os dados foram transformados em raiz quadrada. O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os tratamentos envolvendo a filosfera ou parte aérea das plantas têm interações particulares com um processo de deposição do produto nas plantas que são mais variáveis com a tecnologia de aplicação a ser utilizada. O método PCVe quebra o líquido em gotas menores operando em pressões mais altas, proporcionando maior cobertura dos alvos (JUNIOR, 2018). Com a maior cobertura da planta, obteve melhores respostas sobre a severidade da doença. No entanto, o modo PCVe, que é uma modificação no sistema pós produto, utiliza eletrodos que permitem a formação de um campo eletrostático intenso, induzindo o aparecimento de íons na superfície do líquido, liberados na ponta cônica vazia (CHAIM, 2007).

A eletrodeposição de gotas provoca um maior período de contato do produto com a planta, reduzindo as perdas por evaporação e escoamento por gotas muito finas e grandes, respectivamente (CHAIM, 2007). Nesse sentido podemos indicar que a ação eletrostática põe o elicitor em maior contato com a planta, desencadeando respostas de defesa mais incisivas do que a aplicação por PCV e via solo.

Além disso, a indução pode desencadear as respostas de defesa, e consequentemente, um gasto energético, como os custos de alocação que se referem a grandes quantidades de recursos deslocados para a defesa vegetal, limitando o desenvolvimento e a produção de frutos (BALDWIN e HEIL, 2002). Nesse aspecto, esse estudo indicou que número de frutos comerciais foi maior em PCVe e via solo, contudo, obtiveram menores números de frutos por planta, reforçando um custo energético.

No método via solo, foi depositado 5 mL de LPS na dose de 7,3 µg/ml, com seringa esterilizada, próximo à região basal da planta, direcionando o líquido para que à infiltração no solo fosse ao encontro das raízes. A aplicação de compostos estruturais de microrganismos ao solo é estável e segura, desde que as condições ambientais sejam ideais com solos bem drenados e equilibrados. Solo bem drenado proporciona maior contato do produto com as raízes de forma rápida e eficiente. Sabe-se que os lipopolissacarídeos possuem alta atividade nas interações com as raízes das plantas e estão envolvidos na indução de respostas de defesa das plantas nessas interações (EVSEEVA et al., 2018).

Em geral, embora o peso total de frutos tenha sido prejudicado no modo de aplicação eletrostático, o número de frutos comerciais foi maior. Ou seja, a eletrostática permitiu menor peso total dos frutos, mas os que foram produzidos foram maiores e dentro do padrão comercial. Neste caso, a eletrostática promoveu estabilidade nos parâmetros tanto nas plantas inoculadas quanto nas não inoculadas. Considerando que, entre o peso total de frutos e número de frutos comerciais, o que mais importa é o número de frutos em padrão comercial, método via solo e eletrostático foram os melhores tratamentos. O método via solo, principalmente, pois sempre foi estatisticamente igual ou melhor tratamento.

Neste trabalho, o LPS foi rapidamente reconhecido, obtendo respostas positivas no controle da doença em conjunto com excelentes índices de produtividade, como podemos observar na Tabela 2, principalmente para os métodos PCVe e via solo. No entanto, o método PCVe pode ser mais bem direcionado ao manejo de tomateiro para a indústria, pois os resultados mostraram interferência no número de frutos comerciais, indicando maior número de frutos sem padrão de comercialização, inviabilizando a venda ao mercado comum, mas potencializando para o processamento de tomate industrial.

Os resultados da análise fatorial tripla para o tratamento das interações biomassa foliar seca podem ser vistos na tabela 3. Os resultados da interação tripla indicaram, após o desdobramento dos fatores, em que a interação diferiu dos demais tratamentos foi a combinação PCV, no regime 1, aplicado apenas uma vez em plantas não inoculadas.

A tríplice interação de fatores para biomassa seca da folha indica que em aplicações preventivas o elicitor à base de LPS pode interferir diretamente nos níveis de biomassa, quando escolhemos uma única aplicação no manejo de doenças para o

modo de aplicação PCV. Nesse caso, a defesa da planta é eliciada sem a presença do patógeno, implicando em desvios metabólicos que prepara para responder à infecção. Essa ativação de defesa sem gerar danos do patógeno pode ser verificada nos estudos de Newman et. al (2000), concluindo que o reconhecimento de LPS pelas plantas pode permitir a expressão de resistência na ausência de danos aos tecidos vegetais.

Outro aspecto importante é que esses desvios metabólicos normalmente estão envolvidos na alocação de recursos, seja para o crescimento ou defesa das plantas. Este processo envolve principalmente o crosstalk hormonal, que é referido como a troca de acionamento de compostos de defesa, em vez de desenvolvimento da planta. Entre os hormônios estão: BR (brassinosteroides), GA (giberelina), JA (jasmonatos) e AS (ácido salicílico) (HUOT et al., 2014). Este último é mais explorado neste trabalho, pois está diretamente ligada à ativação da via do fenilpropanóide que é ativada após alta atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL).

Tabela 3 – Análise da interação tripla fracionamento do parâmetro biomassa seca foliar (biomassa seca da parte aérea do tomateiro) em resposta aos modos de aplicação, à inoculação ou não com *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, e regime de aplicações do agente elicitor LPS

Fator	Contrastes	DF	SQ	MS	F	Pr > F
Inoculação	PCVe x Regime 1	1	3,934012	3,934012	0,01	0,9404
	PCVe x Regime 2	1	326,018112	326,018112	0,47	0,4970
	PCVe x Regime 3	1	223,238450	223,238450	0,32	0,5739
	PCV x Regime 1	1	7506,80045	7506,800450	10,73	0,0016*
	PCV x Regime 2	1	1791,011250	1791,011250	2,56	0,1140
	PCV x Regime 3	1	760,500000	760,500000	1,09	0,3006
	Soil x Regime 1	1	1007,622201	1007,622201	1,44	0,2340
	Soil x Regime 2	1	2157,259613	2157,259613	3,08	0,0834

Modo	Soil x Regime 3	1	433,651250	433,651250	0,62	0,4337
	NI x Regime 1	3	6083,589825	2027,863275	2,90	0,0409*
	NI x Regime 2	3	4799,167350	1599,722450	2,29	0,0860
	NI x Regime 3	3	1436,867275	478,955758	0,68	0,5643
	I x Regime 1	3	544,416667	181,472222	0,26	0,8543
	I x Regime 2	3	1003,500000	334,500000	0,48	0,6984
	I x Regime 3	3	630,500000	210,166667	0,30	0,8249
Regime de aplicação	NI x PCVe	2	1663,569617	831,784808	1,19	0,3104
	NI x PCV	2	6383,912600	3191,956300	4,56	0,0137*
	NI x Soil	2	3176,670050	1588,335025	2,27	0,1107
	I x PCVe	2	776,166667	388,083333	0,55	0,5766
	I x PCV	2	2422,166667	1211,083333	1,73	0,1844
	I x Soil	2	334,765152	167,382576	0,24	0,7878

PCVe = Cone vazio com sistema eletrostático, PCV=Cone vazio, Solo=Aplicação por deposição no solo. NI= Não inoculado, I=inoculado, R= Regime de aplicação (1, 2 ou 3 vezes). *Interações significativas ($p < 0,05$). O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

O parâmetro altura de planta foi analisado isoladamente pelo fator regime de aplicação, como pode ser observado na tabela 4. As plantas não inoculadas com o patógeno, como esperado, não foram afetadas pelo número de aplicações de LPS, indicando que o processo de indução de resistência é intensificado somente com a presença do patógeno. Os tratamentos com aplicação do produto LPS + inoculação do patógeno foram capazes de proporcionar diferenças significativas no crescimento das plantas.

Nas plantas não inoculadas, não houve influência da regime de aplicação na altura das plantas, independente do modo de aplicação, mas nas plantas inoculadas

houve diferença significativa. Quando aplicado uma única vez, houve tendência à redução da altura das plantas.

A aplicação única do LPS + patógeno não foi capaz de reduzir a intensidade da doença em conjunto com níveis normais de desenvolvimento da planta. Isso pode ter ocorrido devido à forte supressão do patógeno no primeiro momento, mas durante o desenvolvimento da cultura, a ação do LPS diminuiu, indicando a necessidade de reaplicação. Nesse sentido, os tratamentos com duas e três aplicações proporcionaram maior crescimento das plantas.

Nas três aplicações podem exigir maior redirecionamento de recursos energéticos para o sistema de defesa da planta, o que infere-se ter interferido na altura do tomateiro neste estudo. Após a terceira aplicação de LPS, especificamente no final do período de florescimento e início da frutificação, os dados indicaram que plantas em ritmo de divisão celular pleno, apesar de serem estatisticamente diferentes das duas aplicações, sofreram novamente com redirecionamento de recursos, acionando genes e enzimas de defesa em vez de aumentar o desenvolvimento vegetal.

Em geral, esses efeitos do LPS em plantas parecem estar relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal, pois também é capaz de induzir a divisão celular e ser detectado por receptores de células vegetais que ativam vias relacionadas ao metabolismo bioquímico (CHÁVEZ-HERRERA et al., 2018).

Tabela 4 – Efeito do número de aplicações de LPS (Lipopolissacarídeos) na altura da planta (m), em plantas inoculadas e não inoculadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

Regime	Não Inoculado	Inoculado
1 (22 DAT)	2,16 Aa	1,65 Ba
2 (34 DAT)	1,84 Aa	2,03 Aa
3 (79 DAT)	1,93 Aa	1,94 Aa

DAT = Dias após transplantio. A Tabela 4 representa as diferenças encontradas entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* em diferentes aplicações de extrato bruto de LPS. Letras maiúsculas representam contrastes para a coluna e letras minúsculas para a linha. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

A análise da severidade da doença foi abordada avaliando-se os resultados da interação entre os modos e regime de aplicação de LPS conforme ilustrado na tabela 5. O PCVe foi capaz de reduzir a AACPD em relação ao controle aplicado apenas com água. Nas duas primeiras aplicações, o método proporcionou menores valores

de AACPD, principalmente para a regime 2, pois obteve menor intensidade da doença, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Isso indica a necessidade de reaplicação do produto para melhor desempenho no controle da doença.

O modo PCVe é um método eficiente de aplicação na eletrodeposição de gotas em folhas de tomateiro conforme indicado na Tabela 5 e no controle da doença. No entanto, o método parece ter um limite de aplicação e se faz necessário ajustar a regime de aplicações do agente elicitor LPS, pois aumentou os valores de AACPD.

O método PCV obteve respostas semelhantes após aplicação do produto em uma e três aplicações em relação aos demais tratamentos. Neste tratamento, pode-se inferir que o período de aplicação 1 no início da fase vegetativa e aplicação 2 no início da floração foi curto, com apenas 12 dias, o que explica essa tendência no aumento das AACPD com duas aplicações, e o retorno dos melhores desempenhos com três aplicações.

Em duas aplicações em um curto espaço de tempo de 12 dias, foi notado que proporcionou maiores custos de energia aplicada, provavelmente dividindo rotas metabólicas para defesa e desenvolvimento vegetal. Nesse sentido, o retorno com uma terceira aplicação 25 dias após o início do florescimento foi capaz de reduzir a intensidade da doença, mas o maior intervalo de aplicação interferiu menos acentuadamente na AACPD.

Tabela 5 – Intensidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro, após aplicação de LPS (Lipopolissacarídeos) considerando a interação modo x regime de aplicação

Tratamentos	Regime		
	1 (22 DAT)	2 (34 DAT)	3 (79 DAT)
PCVe	9,26 Ba	11,60 Ca	15,27 Ba
PCV	9,89 Bb	17,90 Ba	12,50 Bab
Via solo	13,03 Ba	14,65 BCa	10,60 Ba
Controle	30,34Aa	30,34 Aa	30,34 Aa

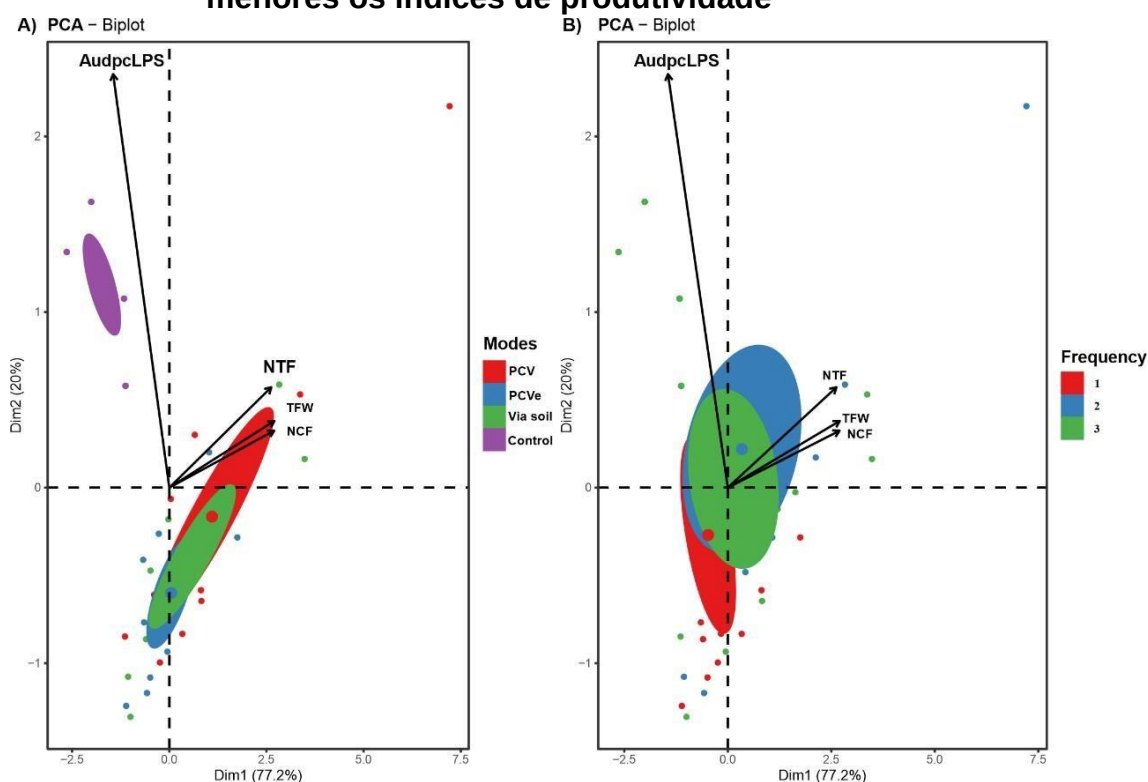
DAT = Dias após o transplântio, Regime 1 = 22 dias após o transplântio, Regime 2 = 34 dias após o transplântio, Regime 3 = 79 dias após o transplântio. Letras maiúsculas representam contrastes para a coluna e minúsculas para a linha. Um teste de LSD médio foi realizado para comparar os tratamentos a 5% de probabilidade. *Dados AACPD transformados em raiz quadrada. O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

A aplicação no solo proporcionou maior redução da intensidade da doença em relação à testemunha e se comportou de forma intermediária aos demais tratamentos. As características de reconhecimento podem ter sido impulsionadas pelas interações íntimas das raízes das plantas e superfícies bacterianas.

Fedonenko et al., (2001) discutiram essa ligação com LPS de bactérias do grupo *Azospirilla* em seus estudos, identificando interações inespecíficas devido à carga e hidrofobicidade da superfície celular bacteriana, bem como interações específicas envolvendo proteínas de superfície e polissacarídeos de células bacterianas. O que ajuda a elucidar desempenhos satisfatórios e estáveis quando os lipopolissacarídeos foram aplicados pelo método via solo.

Análises de Permanova e de componentes principais foram realizadas para melhor expor os parâmetros que, teoricamente, mais influenciam a variabilidade dos dados. Foram selecionados para análise: área de progresso da doença, número de frutos totais, número de frutos comerciais, peso total de frutos e tratamento de controle de água. As análises seguiram os diferentes modos de aplicação (Figura 2A) e a Regime de aplicação (Figura 2B). Após a aplicação de 10.000 permutações na análise, foram encontradas diferenças significativas no teste F apenas para os modos de aplicação utilizados. O teste estatístico de Pillai de comparação pareado ajustado pelo método de Bonferroni foi aplicado para as 10.000 permutações observando as diferenças dentro dos tratamentos.

Figura 2 – Análise de componentes principais para AACPD e os parâmetros de produtividade estudados. Regime 1, 2 e 3 = regime de aplicação de LPS (Lipopolissacarídeos), 1, 2 ou 3 vezes, NTF = número de frutos totais, TFW= número de frutos totais, NCF= Número de frutos comerciais. AudpcLPS = Área sob curva de progresso da doença, PCV = Pulverização em cone oco, PCVe = Pulverização em cone oco + Eletrostático e via solo, Dim. = dimensão dos dados analisados. Os gráficos representam a avaliação dos componentes principais após análise estatística de permutação dos dados (10.000 permutações realizadas) pela Permanova, indicando a interferência entre os grupos AudpcLPS e os parâmetros de produtividade. O gráfico A representa a relação dos diferentes modos de aplicação do elicitor LPS e AACPD, o gráfico B representa a relação do número de aplicações do elicitor LPS e AACPD. Setas com direções e tamanhos diferentes indicam maior interferência entre os parâmetros, por exemplo: AudpcLPS teve forte influência na variação dos dados NTF, TFW e NCF, quanto maior a tendência de aumento do AACPD, menores os índices de produtividade



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

A análise da redução da severidade do oídio do tomateiro (*Oidium neolycopersici*) que ocorreu naturalmente foi realizada logo após a detecção da epidemia fúngica, no finaldo florescimento, influenciando os níveis de produtividade

do tomateiro. Esse aspecto temporal é um fator importante, pois os resultados encontrados não indicam uma forte influência da regime de aplicação na severidade da doença. A variabilidade dos dados e diferenças significativas foram encontradas estudando os modos de aplicação e a redução da severidade do oídio. A quantificação da doença seguiu a escala diagramática proposta por Lage (2012), analisando a severidade nos folíolos do tomateiro.

As análises estatísticas de severidade nos folíolos compostos foram realizadas, primeiramente, pela análise de variância (ANOVA) que indicou através do teste F os níveis de significância. Os resultados indicados para a severidade nos folíolos foram analisados em plantas inoculadas e não inoculadas devido às diferenças estatísticas encontradas que foram condensadas em cada modo de aplicação, independentemente de inoculado com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* ou não, realizando testes de comparação de médias pelo teste LSD ($p < 0,05$).

A tabela 6 mostra os gráficos dos grupos de plantas não inoculadas e inoculadas (A e B, respectivamente) com o patógeno bacteriano. Para o grupo de plantas não inoculadas, os melhores desempenhos na redução da severidade do oídio do tomateiro nos tratamentos PCVe via solo mantiveram bons desempenhos do controle, enquanto o tratamento PCV não foi capaz de diferir do controle. No entanto, plantas inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* sofreu menos impacto da epidemia de oídio do que o controle, com todos os modos de aplicação sendo eficientes na redução do AACPD. Esse aspecto controverso é explicado pelo fato de que a ocorrência espontânea de oídio, apesar de generalizada, iniciou-se principalmente em plantas não inoculadas. Nesse sentido, é importante discutir que no quadro geral da epidemia natural, os tratamentos foram eficientes no controle da doença independentemente do número de aplicações e do grupo de plantas inoculadas ou não. Reforçando a eficiência do agente elicitor LPS de forma prolongada e inespecífica.

Outra característica importante está associada ao gene central tssM do sistema de secreção do tipo IV que desempenha um papel significativo durante a colonização epifítica assintomática inicial, pois esse gene prolonga a associação do patógeno hemibiotrófico com o hospedeiro (LIYANAPATHIRANAGE et al., 2022). Essa associação indica maior exposição dos componentes da parede celular bacteriana que são facilmente reconhecíveis (caracterizados neste caso como PAMPs), proporcionando uma indução de resistência mais incisiva quando aplicado o elicitor + a inoculação da Xep. No entanto, o índice de eficiência na redução de AACPD para

oídio merece mais atenção e investigações mais precisas para melhor elucidar os cursos de ação que sustentam os bons resultados encontrados neste trabalho.

Para o oídio, neste caso se verifica que, apesar do oídio ter iniciado mais tarde em plantas inoculadas com a Xap, no final, a severidade do oídio foi maior em plantas inoculadas com a Xap. Destacando-se os métodos PCVe e via solo, que apresentaram menor severidade do oídio do tomateiro.

Os tratamentos inoculados que receberam elicitor (plantas apenas inoculadas com a *Xanthomonas* sp., plantas aplicadas com LPS + a *Xanthomonas* sp.), independentemente do método, todos apresentaram menor severidade do oídio. Novamente, o método eletrostático e via solo foram os melhores no controle de doenças.

Os resultados nos indica o processo de defesa vegetal, foi decaindo ou reduzindo a intensidade ao decorrer do tempo, interferindo, nos primeiros estádios do processo infectivo da *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep). No 39º dia após a inoculação do patógeno cessou o avanço da mancha bacteriana e ao 11º dia depois apareceram os sintomas do oídio (ao 50º dia após a inoculação da Xep), inferindo a necessidade de mais uma aplicação, principalmente nas plantas não inoculadas com a Xep., que foram as plantas não receberam o estímulo da indução após a aplicação do patógeno bacteriano. Nesse sentido, os resultados foram convergentes pois terceira e ultima aplicação ocorreu ao 57º dia após a inoculação do patógeno, o que proporcionou menores valores de intensidade da doença em plantas não inoculadas com a Xep.

Tabela 6 – Intensidade do oídio do tomateiro em plantas inoculadas e não inoculadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep), após a aplicação de LPS em folíolos de tomateiro por análise de AACPD (Área sob a curva do progresso da doença)

Tratamentos	AACPD	
	Não Inoculado com Xep	Inoculado com Xep
PCVe	27,95 Ba	22,27 Ba
PCV	34,58 Aa	19,90 Ba
Via solo	30,45 Ba	22,23 Ba
Controle	34,72 Ab	39,69 Aa

PCVe = Spray de cone vazio + Eletrostático; PCV = Spray de cone vazio. Letras diferentes maiúsculas e minúsculas indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

As coletas para análise das expressões gênicas foram realizadas logo após a terceira aplicação do agente elicitor. Foram escolhidas duas enzimas relacionadas às alterações proporcionadas na aplicação anterior de LPS em plantas nos ensaios de severidade da doença, com base na literatura e resultados de testes anteriores neste trabalho. As enzimas polifenol oxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (PAL) são enzimas bem descritas na literatura por sua capacidade de induzir diversas alterações fisiológicas em plantas após interações planta-patógeno.

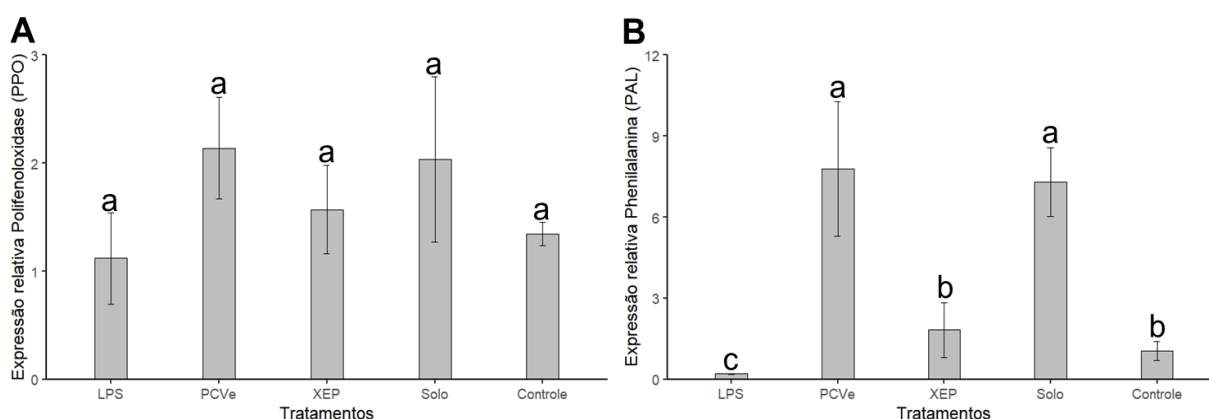
Na Figura 3, gráfico A, podemos ver a expressão diferencial do gene marcado para a enzima PAL. A aplicação prévia de LPS juntamente com a inoculação de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* nos métodos de aplicação selecionados anteriormente, proporcionou a alta atividade desse gene condicionando a produção da enzima, chegando aproximadamente a oito vezes maior que o tratamento controle (aplicado apenas com água). Isso corrobora com estudos de síntese enzimática relacionados à transcrição de PAL, como a síntese dos conjugados fenólicos cumaroil tiramina (CT) e feruloil tiramina (FT). Esses compostos, formados após a inoculação bacteriana, catalisam os primeiros passos da via dos fenilpropanóides (NEWMAN et al., 2000) e estão diretamente associados à defesa da planta, com aumento da produção de ácido salicílico.

O ácido salicílico, por sua vez, é influenciado por um gene BSMT1 que codifica a proteína SA e é regulado pela formação do salicilato de metila (MeSA), impedindo a toxicidade do seu acúmulo (CHEN et al., 2003). É este MeSA que provavelmente está associado a sinais de translocação na planta via floema na ativação de respostas de defesa do tipo SAR em tecidos vegetais que ainda não infectados (PARK et al., 2008).

Nesse sentido, a expressão de um gene relacionado ao gene PAL corrobora a prerrogativa de interferir nas vias fisiológicas da planta e na translocação de sinal, pois, ao aplicar o LPS, os processos de sinalização de defesa foram acionados antecipadamente, com a planta reagindo mais intensamente no elicitor + aplicação do patógeno do que com o patógeno somente (Figura 3 B). Essas interferências em regiões distantes dos pontos de infecções primárias, permitem elucidar melhor a eficiência da aplicação via solo e a redução significativa da severidade pela aplicação com eletrostática. Na aplicação com eletrostática, o maior contato provavelmente ajudou a sinalizar as demais regiões da planta de forma mais prolongada. É importante salientar as plantas têm receptores nas raízes capazes de perceber a presença

desses elicitores, independentemente se vieram de uma rizobactéria ou de uma bactéria fitopatogênica.

Figura 3 – Análise da expressão diferencial de genes relacionados à defesa vegetal. LPS = Lipopolissacarídeos, PCVe = aplicação do Indutor de LPS + aplicação de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* + PCVe (Spray de cone vazio + Eletrostático) modo de aplicação, Solo = aplicação do indutor de LPS + aplicação de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* + modo de aplicação via solo, XEP = aplicação somente de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Os gráficos representam as diferenças encontradas em cada gene relacionado à defesa da planta, fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenoloxidase gráfico A (PPO) e gráfico B. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste de LSD a 5% de probabilidade nível na expressão relativa em Delta Delta ct indicada no eixo X.



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

Como pode ser visto na Figura 3 A, as respostas à polifenoloxidase não apresentaram diferenças significativas em seus tratamentos quanto ao controle aplicado apenas com água. Em comparação com a PAL, podemos verificar que os tratamentos LPS PCVe + *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e LPS via solo + *X. euvesicatoria* pv. *perforans* proporcionaram maior mudança na expressão gênica. No entanto, a tendência de expressão não foi significativa para PPO, inferindo aspectos de preferência por vias de ativação de defesa vegetal e regulação gênica.

Sabe-se que as respostas de defesa das plantas contra patógenos gastam energia e que normalmente empregam uma via específica ao reconhecer patógenos distintos (LI et al. 2019). Nesse sentido, as fitobactérias possuem particularidades que

podem influenciar nessa via de ação. No caso específico de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, é um patógeno com comportamento hemibiotrófico, primeiro estabelecendo células infectantes na filosfera do tomateiro e só posteriormente iniciando o processo de infecção (LIYANAPATHIRANAGE et al., 2022). Essa característica provavelmente influenciou o potencial de alocação de energia. Já os esforços das plantas foram induzidos pelo elicitor LPS, eficiente em impedir estabelecimento do patógeno, priorizando vias de ação que proporcionassem maior eficiência no controle da mancha bacteriana.

O ácido salicílico, conhecido por atuar de forma mais eficiente no processo de infecção, pois a rota dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – imunidade desencadeada por PTI e imunidade por efector (ETI) (LI et al., 2019), pode ser acionada após o reconhecimento do patógeno. Esse acionamento pode ser pela via da fenilalanina amônia-liase (PAL), já que o AS é sintetizado através da rota do fenilpropanoide, iniciando a partir da fenilalanina e a via dos isocorismato (VICENTE e PLANSENCIA, 2011). A alta atividade de genes PAL pode indicar essa alta formação de salicilatos, indicando também uma priorização deste curso de ação pela AS em detrimento de outras vias de ação. Essa priorização provavelmente foi regulada pelo antagonismo das vias dos fitohormônios. As vias de sinalização de defesa mediadas por SA são controladas principalmente no nível da transcrição gênica, induzindo reguladores negativos a interferir nos fatores de transcrição regulados por etileno/jasmonato que, por sua vez, estão ligados à ativação de enzimas como a polifenol oxidase. Elucidando melhor as diferenças não significativas para PPO neste estudo.

Essa ação de crosstalk é evidenciada nos experimentos de Li et al. (2004) relatando a expressão do fator de transcrição WRKY induzido por SA suprimindo a expressão do gene PDF1.2 fortemente relacionado ao ácido jasmônico.

1.5 CONCLUSÕES

A aplicação do extrato bruto de lipopolissacarídeo foi eficiente na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro e no controle do oídio do tomateiro. Os melhores métodos de aplicação para LPS foram os métodos PCVe via solo, pois proporcionam melhores índices na redução da severidade das doenças estudadas. O método via solo no contexto geral das análises foi o mais eficiente, pois conseguiu aliar menor severidade da doença e ganhos de produtividade, proporcionando uma melhor indicação ao produtor em termos de manejo agrônômico da cultura tomateiro. Conclui-se que a aplicação via solo promoveu maior ganho em produtividade e redução da intensidade da doença.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMIAN, P. *et al.* Epidemiology, diversity, and management of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.105, p.6143-6158, 2021.
- ABRAHAMIAN, P.; JONES, J. B.; VALLAD, G. E. Efficacy of copper and copper alternatives for management of bacterial spot on tomato under transplant and field production. **Crop Protection**, v.126, p.104919, 2019a.
- ADHIKARI, P. *et al.* Advances and Challenges in Bacterial Spot Resistance Breeding in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p.1734, 2020.
- AGRIOS, G. N. Plant pathology. 15. Ed. Florida: **Elsevier Academic press**, 2005.
- ANA, L. A. B. **Expressão diferencial de genes induzidos por antracnose em feijoeiro em resposta à indução de resistência por silício**. TESE (DOUTORADO EM CIÊNCIAS) Centro de energia nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, p.172, 2012.
- ANDERSEN, E. J. *et al.* Disease resistance mechanisms in plants Genes. **Genes (Basel)**, v.9, p.339, 2018.
- ARAÚJO, E. R. *et al.* *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. **European Journal of Plant Pathology**, v.143, p.543–548, 2015.
- ARDEBILI, Z. O. *et al.* The induced physiological changes by foliar application of amino acids in *Aloe vera* L. plants. **Plant Omics**, Brisbane, v.5(3), p.279–284, 2012.
- BARAK, J. D. *et al.* Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. **Front Plant Science**, v.7, p.1805, 2016.
- BARBOSA, A. S.; MEDEIROS, M. B. Potência de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência sistêmica vegetal. Porto Alegre-RS, **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1453-1457, out. 2007.
- BARROS, F. C. *et al.* Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.231-239, 2010.
- BAESSO, M. M. *et al.* Avaliação da uniformidade de distribuição volumétrica de bicos hidráulicos. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v.17(2), p.120-127, 2009.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL J. L. Plant disease resistance proteinsignaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion Plant Biology**, v.7, p.391, 2004.

BLUME, B. *et al.* Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. **Plant Cell**, v.12, p.1425-40, 2000.

BOUBAKRI, H. Induced resistance to biotic stress in plants by natural compounds: Possible mechanisms. **Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants**, p.79-99, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817892-8.00005-2>

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa, (Comunicado Técnico, 87), 2003.

CASABUONO, A. *et al.* Structural Analysis and Involvement in Plant Innate Immunity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Lipopolysaccharide. **The journal of biological chemistry**, v.286, p.25628-25643, 2011.

CHANG, M. *et al.* PTI and ETI: convergent pathways with diverse elicitors. **Trends in Plant Science**, v.27(2), p.113-115, 2022.

CHÁVEZ-HERRERA, E. *et al.* Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 Lipopolysaccharides on Wheat Plant Development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.37(3), p. 859–866, 2018.

CHAIM, A. **Desenvolvimento de um pulverizador eletrohidrodinâmico: avaliação do seu comportamento na produção de gotas e controle de trips (*Enneothrips flavens* Moulton), em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal, p. 107, 1984.

CHAIM, A. *et al.* **Avaliação de perdas de pulverização em culturas de feijão e tomate**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, (Embrapa Meio Ambiente, Boletim de Pesquisa, 2), p.29, 1999a.

CHAIM, A.; LARANJEIRO, A. J.; CAPALBO, D. M. F. Bico pneumático eletrostático para aplicação de inseticidas biológicos em floresta de eucalipto. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente, (Boletim de Pesquisa, 3)**, p.33, 1999.

CHAIM, A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L. Eficiência de deposição de agrotóxicos, obtida com bocal eletrostático para pulverizador motorizado costal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.497-501, 2002.

CHEN, F. *et al.* An *Arabidopsis thaliana* gene for methyl salicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. **The Plant Journal**, v.36(5), p.577–588, 2003.

COFFEE, R. A. Electrodynamics crop spraying. **Outlook on Agriculture**, Elmsford, v.10 (7), p.350-356, 1981.

EGEL, D. S. *et al.* Distribution and characterization of *Xanthomonas* strains causing bacterial spot of tomato in Indiana. **Plant Health Progress**, v.19, p.319-321, 2018.

EVSEEVA, N. V. *et al.* Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v.34(1), p.3, 2018.

FAO, 2022. **Statistical Dates**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. acesso em:30/10/2022.

FATHI, F., RISEH, R. S.; MORANDI, M. The Effects of Biocontrol *Bacillus* and *Pseudomonas* Strains on Plant Growth and Biochemical Defense Mechanisms in Pistachio Seedlings Inoculated with *Phytophthora Drechsleri*. **Pistachio and Health Journal**, v.1(3), p. 15-26, 2018.

FEDONENKO, Y. P. *et al.* Involvement of the lipopolysaccharides of *Azospirilla* in the interaction with wheat seedling roots. **Microbiology**, v.70, p.329–334, 2001.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed: Viçosa: **Editora UFV**, p.412, 2003.

GLAWE, D. A. The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.46, p.27-51, 2008.

GUZMÁN-PLAZOLA, R. A.; DAVIS, R. M.; MAROIS, J. J. Effects of relative humidity and high temperature on spore germination and development of tomato powdery mildew (*Leveillula taurica*). **Crop Protection** v.22, p.1157-1168, 2003.

HARVEY, M.; QUILLEY, S.; BEYNON, H. Exploring the tomato: transformations of nature, society, and economy. **Cheltenham, Edward Elgar**, p. 324, 2002.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.387-412, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R. Systemic acquired resistance. In: Van Loon, L.C., ed. **Advances in botanical research. Academic Press**, p. 324, 2009.

HAMMERSCHMIDT, R. e KUC, J. Induced Resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology). **Kluwer Academic Pub**, v.4, p.182, 1995.
HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular Microbiology**, v.9, p.1-12, 2007.

HENRY, G.; THONART, P.; ONGENA M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnology, agronomy and Environment**, v.16(2), p.257-268, 2012.

HETHERINGTON, A. M.; BROWNLEE, C. The generation of Ca²⁺ signals in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.263-88, 2004.

HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J. e VAN PELT, J. A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, v.86, p.757-62, 1996.

HORVATH, D. M. *et al.* Transgenic Resistance Confers Effective Field Level Control of Bacterial Spot Disease in Tomato. **Plos one**, v.7(8), p. 42036, 2012.

HUANG, C. H. *et al.* Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, v.96, p.221– 227, 2012.

HUOT, B. *et al.* Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. **Molecular Plant**, v.7, p.1267-1287, 2014.

IEA, 2019. Dados de produção paulista. **Secretaria de agricultura e abastecimento e o Instituto de economia agrícola (IEA) de São Paulo**. <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/index.php>. Acesso em: 30/10/2020.

IIZASA, S. *et al.* Transcriptome analysis reveals key roles of AtLBR-2 in LPS-induced defense responses in plants. **BMC Genomics**, v.18(1), p.995, 2017.

JACOB, D.; DAVID, D. R.; ELAD, Y. Biology and biological control of tomato powdery mildew (*Oidium neolycopersici*). **Biological control of fungal and bacterial plant pathogens IOBC/wprs Bulletin**, v.30, p.329-332, 2007.

JONES, J. B. *et al.* Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, v.76, p.430–434, 1986.

JONES, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v14, p.946-961, 2013.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The Plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

JONES, J. B.; PARET, M. L. Nano-magnesium oxide: a novel bactericide against copper tolerant *Xanthomonas perforans* causing tomato bacterial spot. **Phytopathology**, v.109, p.52-62, 2018.

JUNIOR, A. M. **Pontas de pulverização e qualidade da aplicação com pulverização costais. Revista Cultivar**. 2018. <https://revistacultivar.com.br/artigos/pontas-de-pulverizacao-e-qualidade-da-aplicacao-com-pulverizadores-costais>. Acessado em 13 de abril de 2022.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** v.60, p.969–979, 1970.

KLEIN-GORDON, J. *et al.* Assessing changes and associations in the *Xanthomonas perforans* population across Florida commercial tomato fields via a state wide survey. **Phytopathology**, 08 de abril de 2021.

KRÖNER, A. *et al.* Quantitative resistance of potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: Integrating PAMP-Triggered response and pathogen growth". **PLoS ONE**, v.6(8), p.2333, 2011.

KUTSCHERA, A.; RANF, S. The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. **Biochimie**, v.159, p.93-98, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.028>

LAGE, D. A. C. Epidemias de oídio e requeima do tomateiro orgânico em diferentes sistemas de irrigação: quantificação e progresso temporal. **Tese (Dourado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília**, Brasília, 105, 2012.
<https://repositorio.unb.br/handle/10482/14448>. Acessado em 05 de maio 2022.

LAVANYA, S. N. *et al.* Immunity elicitors for induced resistance against the downy mildew pathogen in pearl millet. **Nature scientific reports**, v.12, p.4078, 2022.

LEE, S. *et al.* Nucleolar GTP-Binding Protein 1-2 (NOG1-2) Interacts with Jasmonate-ZIM Domain Protein 9 (JAZ9) to regulate Stomatal Aperture during Plant Immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.1992, 2018.

LIAO, Y. Y. *et al.* Nano-Magnesium Oxide: A Novel Bactericide Against Copper-Tolerant *Xanthomonas perforans* Causing Tomato Bacterial Spot. **Disease Control and Pest Management**, v.109, p.52-62, 2019.

LIYANAPATHIRANAGE, P.; JONES, J. B.; POTNIS, N. Mutation of a Single Core Gene, tssM, of Type VI Secretion System of *Xanthomonas perforans* Influences Virulence, Epiphytic Survival, and Transmission During Pathogenesis on Tomato. **Phytopathology®** v.112(4), p.752–764, 2022.

LI, N. *et al.* Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/Jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering ?. **International Journal of Molecular Sciences MDPI**, v.20, p.671, 2019.

LIU, W.; SAINT D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.294, p.347-353, 2002.

LOUWS, F. J. *et al.* Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v.85, p.481, 2001.

MALIK, N. A. A.; KUMAR, I. S.; NADARAJAH, K. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.963. <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Brasil (1995) **Portaria Nº 553**, 30 de agosto, Norma de identidade, qualidade, acondicionamento, embalagem e apresentação tomate. Disponível em:
https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/portaria+553_95_000gl3vxjrx02wx5ok0xkgyq582yfj4l.pdf. Acesso em: 04 de maio de 2022.

MATUO, T. **Técnicas de aplicação de defensivos agrícolas**. Jaboticabal: FUNEP, p.139, 1990.

MARTÍNEZ, F.; OLIVEIRA, J. A.; CALVETE, E. O.; PALENCIA, P. Influence of growth medium on yield, quality indexes, and SPAD values in strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v.217, p.17-27, 2017.

MELLO, S. C.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Diagrammatic scale for evaluation of tomato bacterial spot. **Fitopatologia Brasileira** v.22(3), p.447-448, 1997.

MEZIANE, H. *et al.* Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 are involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v.6(2), p.177-185, 2005.

MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. **Plant Journal**, v.50, p.500–513, 2007.

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

MORAES, W. B. *et al.* Aplicação foliar de fungicidas e produtos Alternativos reduz a severidade dooídio do tomateiro. **Nucleus**, v.8, outubro, 2011.

MCGUIRE, R. G. *et al.* Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and bacterial spot of tomato as influenced by nitrogen and potassium fertilization. **Phytopathology**, v.81, p.656– 660, 1991.

MISHRA, B. B.; GAUTAM, S. Polyphenol Oxidases: Biochemical and Molecular Characterization, Distribution, Role, and Its Control. **Enzyme Engineering**, v5, p.141, 2016. <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000141>

MÜLLER, O. A.; JAN GRAU, J.; THIEME, S.; PROCHASKA, H.; ADLUNG, N.; SORGATZ, A.; BONAS U. (2015) “Genome-wide identification and validation of reference genes in infected tomato leaves for quantitative RT-PCR analyses”. **PLoS ONE**, v.10(8), p.1–22, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136499>

NADARAJAH, K.; KASIM, N. M.; FUI, V. V. Function of Mitogen-Activated Protein Kinase Gene in Biotic Stress. **Asian Journal Plant Science**, v.8, p.191–198, 2009. <https://doi.org/10.3923/ajps.2009.191.198>

NAFIE, E.; MAZEN, M. Chemical-induced resistance against browns tem rot in soybean: The effect of benzothiadiazole. **Journal of Applied Sciences Research**, v.4, p.2046–2064, 2008.

NEWMAN, M. A. *et al.* Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant Pathology**, v.1(1), p. 25-31, 2000.

NOVAES, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.10-13, 2004.

NÜRBERGER, T. *et al.* High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Plant Cell**, v.78, p.449-60, 1994.

OKEY, E. N.; SREENIVASAN, T. N. Salicylic acid: a factor in systemic resistance of cacao to *Phytophthora palmivora*. In: Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. **British Crop Protection Council**, v.3, p.955-60, 1996.

PALTI, J. The *Leveillula mildews*. **The Botanical Review**, v.132, p.423- 535, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02858418>

PARK, S. W. *et al.* Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. **Science** v.318, p.113-116, 2007.

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

PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Uso de indutores de resistência: conceito, realidade e perspectivas. In: **FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Milho: manejo e produtividade**. Piracicaba: USP/ESALQ/IPV, p.177- 181, 2009.

PASCHOLATI, S. F.; MELO, T. A.; RONALDO, J. D. **Visão agrícola**, Piracicaba, n13, p. 110-112, 2015. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA_13_Protecbox1.pdf. Acesso em: 22 out. 2022.

PREININGER, C. *et al.* “Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants”. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102(17), p.7265-7282, 2018.

PROKOP, M.; VEVERKA, K. Influence of droplet spectra on the efficiency of contact fungicides and mixtures of contact and systemic fungicides. **Plant Protection Science**, Prague, v.42(1), p.26-33, 2006.

POHRONEZNY, K. *et al.* Sudden shift in the prevalent race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper fields in South Florida. **Plant Disease**, v.76, p.118–120, 1992.

POTNIS, N. *et al.* Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular Plant Pathology**, v.16, p. 907–920. 2015.

QIAO, K. *et al.* Management of bacterial spot of tomato caused by copper-resistant *Xanthomonas perforans* using a small molecule compound carvacrol. **Crop Protection**, v.132, p.105-114, 2020.

RAIJ, B. V. *et al.* Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo. **Instituto Agrônomo/Fundação IAC**, 2 ed. p.184–185, 1997. ISSN: 0100-3100

RAAIJMAKERS, J. M. *et al.* Dose response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, V.85, P.1075-81, 1995.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M. Natural plant protection by 2,4 diacetyl phloroglucinol producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.11, p.144-52, 1998.

RESENDE, M. L. *et al.* Percepção e transdução desinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **RAPP**, Lavras-MG. v.15, 2013.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28(2), p.123-130, 2003.

RIVAS-SAN, V. M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defense: Its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.3321-3338, 2011. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>

RIETSCHER, E. T. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **The FASEB Journal**, v. 8(2), p. 217– 225, 1994.

SCHONINGER, E. L.; GATIBONI, L. C.; LINHARES, D. Mehlich 3 method as substituent to the HCl method for extraction of Copper and Zinc in soils from Southern Brazil with high levels of organic matter. **Ciência Rural**, v.42(7), p.1200-1203, 2012.

SIAH, A. *et al.* Natural Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Diseases. **Natural Antimicrobial Agents**, p.121–159, 2018.

SILIPO, A. *et al.* The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. **Journal Biology Chemistry**, v.280, p.33660– 33668, 2005.

SIMÕES, C. T.; CARVALHO, V. N.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Prospecting of pathogen-derived elicitors for the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Protection Research** v.61(2), p.183–188, 2021.

STALL, R. E.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. **Annual Review Phytopathology** 47:265–284, 2009.

STEFFENS, T. *et al.* The lipopolysaccharide of the crop pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*: Chemical characterization and determination of signaling events in plant cells. **Glycobiology** 27 (3):264–274, 2017.

STEINER, U.; SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt, R. e Kuc` J. (eds.). Induced Resistance to Disease in Plants – Developments in Plant Pathology. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, v.4, P.86-110, 1995.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry Academic Press**, p.387-416, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p.819, 2009.

THAYER, P. L.; STALL, R. E. The survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.75, p.163–165, 1962.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, v. 138(4), p.414–429. 2010.

TUZUN, S., KLOEPPER, J. Practical application and implementation of induced resistance. In: KUC, J. (Ed.). Induced resistance to diseases in plants. Dordrecht, The Netherlands: **Kluwer Academic Press**, p.152-68, 1995.

VALLAD, G. E. *et al.* Comparison of kasugamycin to traditional bactericides for the management of bacterial spot on tomato. **Hortscience**, v.45, p.1834-1840, 2010.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A.; PIETERSE, C. M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-83, 1998.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia-lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, p. 68-71, 2006.

VOS, I. A.; PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M. Costs and benefits of hormone-regulated plant defenses. **Plant Pathology**, v.62(1), p.43–55, 2013.

WALTERS, D.; FOUNTAINE, J. Practical application of induced resistance to plant diseases: An appraisal of effectiveness under field conditions. **Journal Agriculture Science**, v.147, p.523, 2009.

ZHANG, J.; SUN, X. Recent advances in polyphenol oxidase-mediated plant stress responses. **Phytochemistry**, v.181, p.112588, 2021.

ZHOU, T.; PAULITZ, T. C. Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. On cucumber. **Journal of Phytopathology**, v.142, p.51-63, 1994.

CAPÍTULO 2

UTILIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE FLAGELOS DE *Xanthomonas* spp. NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA E ATIVIDADES DIFERENCIAIS DE ENZIMAS E GENES RELACIONADOS À DEFESA DA PLANTA

2.1 INTRODUÇÃO

A mancha bacteriana do tomateiro é uma das doenças mais importantes da cultura, percorrendo praticamente todos os grandes centros produtivos no mundo, causada por quatro linhagens: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, e *Xanthomonas vesicatoria* (OSDAGHI et al., 2021). No Brasil, a doença tem ampla ocorrência com predominância da espécie *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (ARAÚJO et al., 2017), resultando em perdas muito significativas na produção de tomate. Os métodos utilizados no controle da doença consistem basicamente em um número limitado de produtos químicos registrados com base cúprica para aplicação, o que tem selecionado populações de isolados bacterianos resistentes (DE SÁ e TEBALDI, 2022), e o uso de sementes saudáveis, bem como aplicações preventivas de produtos protetores em sementes.

Na ocorrência de ambas as doenças (mancha bacteriana e oídio) de forma isoladas ou não, o manejo é dificultado pelo longo período em que a planta está em condições permissivas à infecção, o que requer várias aplicações de agroquímicos, onerando os custos de produção e a ocorrência da bioacumulação de substâncias tóxicas na cadeia alimentar (ENEBE e BABALOLA, 2019). Portanto, novas estratégias ou alternativas de manejo são necessárias para permitir sustentabilidade na produção de tomate com menores impactos ambientais, usos de recursos naturais (LUNA-DIEZ, 2016) e sustentabilidade financeira. Nesse contexto, produtos biológicos e indutores de resistência ganham muito espaço por suas características não agressivas ao meio ambiente e uma fonte alternativa eficiente no controle de doenças de plantas.

A indução de resistência em plantas é uma ferramenta auxiliar no manejo de doenças que utiliza elicitores de base biológica e/ou química. Esses elicitores são componentes que podem ser reconhecidos por plantas e levar à expressão sistêmica de uma ampla variedade de genes, codificando enzimas com propriedades antimicrobianas. Este é um fenômeno comumente reconhecido como resistência

adquirida sistêmica (SAR). A SAR pode ser acionada através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como estruturas altamente conservadas como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), lipoproteínas e flagelina (FAILLACE et al., 2019).

A flagelina é um componente estrutural presente nos flagelos bacterianos como um órgão de locomoção associado, principalmente nas bactérias Gram-negativas. A flagelina é caracterizada por ter dois domínios (D1 e D2) e regiões N- e C- terminais com terceiro domínio hipervariável (D3) (HAJAM et al., 2017). No núcleo desses domínios e regiões terminais é conhecido 22 aminoácidos conservados da flagelina bacteriana, conhecido como flg22. Estes estão associados a indução e a expressão de vários genes relacionados à defesa, desencadeando a produção de enzimas relacionadas a resistência das plantas (ZHAO et al., 2020).

Os extratos brutos de componentes celulares bacterianos, tais como a flagelina, estão entre as mais promissoras fontes de produtos a serem inseridos no mercado agrícola por sua eficiência no controle de doenças de plantas e pela classificação verde, estando dentro dos produtos “biológicos” com ação não agressiva ao meio ambiente.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 Gênero *Xanthomonas*

As espécies de *Xanthomonas* que causam a mancha bacteriana do tomateiro, durante a década de 1990, foram separadas em três grupos diferentes conforme isolamento e características morfofisiológicas semelhantes, deixando dois grupos geneticamente distintos dentro de *X. campestris* pv. *vesicatoria* com isolados da África do sul no grupo A e isolados dos Estados Unidos no grupo B (STALL et al., 1994). O terceiro grupo de cepas amilolíticas e pectolíticas originário da Flórida direcionado para o grupo C (Jones et al., 1995). Contudo, estudos de Vauterin et al. (1995) reclassificaram todas as *Xanthomonas*, dividindo a *X. campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (cepas do grupo A e C) e *X. vesicatoria* (cepas do grupo B).

Após técnicas de hibridização com *Xantomonas* patogênicas de tomate e pimenta, elas foram reclassificadas em quatro espécies independentes, *X. euvesicatoria* (grupo A), *X. vesicatoria* (grupo B), *Xanthomonas perforans* (grupo C) e *Xanthomonas gardneri* (grupo D) (JONES et al., 2004). Análises de sequências de DNA com o método multilocus (MLSA) mostraram que as espécies *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *Xanthomonas alfalfae* não eram completamente distintas (YARIPOUR et al., 2018), confirmado apenas após análises filogenéticas baseadas na sequência de genoma completo (BARAK et al., 2016). Assim, as duas espécies *X. euvesicatoria* e *X. perforans* foram reclassificadas como patovares da mesma espécie que *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* e *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, respectivamente (CONSTANTIN et al., 2016).

2.2.2 Manejo e controle da mancha bacteriana do tomateiro

A mancha bacteriana do tomateiro é conhecida como uma doença complexa, causada por um conjunto heterogêneo de espécies de *Xantomonas*, ocorrendo em muitos países em tomates cultivados em estufas e em campo, com uma importância nas áreas caracterizadas por condições quentes e úmidas (OSDAGHI et al., 2021).

No Brasil, a mancha bacteriana do tomateiro possui até quatro agentes causais (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans* e

Xanthomonas vesicatoria) (QUEZADO-DUVAL et al., 2004). Essa nomenclatura foi revista, tornando-se mais usual nos resultados de novos estudos moleculares que propuseram a alteração da nomenclatura de *X. perforans* para *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (ABRAHAMIAN et al., 2021).

A sintomatologia é bem descrita nos estudos de ODASHI et al. (2021), nesse estudo, os autores descrevem as características da mancha bacteriana incluindo: lesões inicialmente parecendo está com aspecto de encharcamento cercadas por clorose que se desenvolvem em manchas necróticas em todas as partes aéreas das plantas. Já nos frutos verdes de tomate ocorrem pequenas manchas verde-claras encharcadas com halos branco-esverdeados, tornando-se marrom-escuras e ligeiramente afundadas com uma superfície escamosa.

O manejo da mancha bacteriana do tomateiro é dificultado por sua ampla disseminação e baixa eficiência de produtos registrados para cultura do tomateiro. Existem vários produtos registrados para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, desde produtos à base de cobre, produtos biológicos e indutores de resistência (BRASIL, 2022). No entanto, o uso contínuo de antibióticos, como estreptomicina e oxitetraciclina, e fungicidas cúpricos levou a seleção de populações de *Xanthomonas* spp. resistentes a esses produtos (QUEZADO-DUVAL et al., 2004).

Ações integradas podem ser uma saída para o manejo da mancha bacteriana, os trabalhos de ABRAHAMIAN et al. (2019) indicaram que a melhor estratégia de manejo a ser adotada é a exclusão, utilizando o uso de sementes e mudas saudáveis e livres do patógeno. Utilizando-se em conjunto com a aplicação de produtos químicos protetores ou tratamentos biológicos visando reduzir a severidade da doença e a propagação durante a produção de mudas (ABRAHAMIAN et al., 2019).

Devido a essa baixa eficiência, produtos considerados alternativos vêm sendo investigados e prospectados para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, tais como o Acibenzolar-S-metil (ASM) e outros indutores. O ASM é um dos indutores abióticos mais utilizados no manejo de doenças de plantas, pois apresenta um amplo espectro de ação, seja antimicrobiana ou de ação não direta contra patógenos. Ele age induzindo a ativação de genes que codificam proteínas PR e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (RESENDE et al., 2007a). Dentre os indutores mais utilizados, além do ASM, destacam-se o ácido β -aminobutírico (BABA) e quitosana (JAKAB et al., 2001). Provavelmente, o BABA induz a produção de proteínas PR, assim como ocorre com o ASM.

Extratos vegetais e óleos essenciais também vêm sendo utilizados com a essa finalidade indutora de resistência efetiva em diversos patossistemas. Uma referência de produto obtido de extratos vegetais na indução de resistência de plantas contra patógenos é produto comercial Ecolife®, ao qual trata-se de um extrato proveniente de biomassa cítrica, registrado como fertilizante junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e que possui selo de certificação orgânica, composto por bioflavonoides cítricos, fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico (CAVALCANTI al., 2006; FURTADO et al., 2010).

De acordo com FURTADO et al. (2010), o Ecolife® pode atuar por indução de resistência ou por ação direta contra os fitopatógenos. CAVALCANTI et al. (2006), evidenciaram a ação do produto contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) do tomateiro, com aumento da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas.

2.2.3 Indução de resistência para bactérias fitopatogênicas

O manejo de bactérias fitopatogênicas continua sendo um grande entrave para diversas culturas em um contexto mundial, seja pela ineficiência econômica dos bactericidas disponíveis no mercado ou por ausência de produtos biológicos estáveis e eficazes no controle. Para indução de resistência, várias alternativas estão sendo consideradas como: certas substâncias químicas, formas não virulentas do agente patogênico, raças incompatíveis ou agentes não patogênicos e antagonistas, além da utilização de macromoléculas proteicas na resposta de defesa em plantas (GÖRLACH et al., 1996).

Lanna-filho et al. (2010) utilizando frações de proteínas extraídas de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus* contra *Xanthomonas vesicatoria*, uma das causadoras da mancha bacteriana do tomateiro, ao pulverizar as duas concentrações de proteínas de *Bacillus* spp. reduziram a severidade da doença em cerca de 63 e 56% respectivamente.

Em estudos de Ferraz et al. (2015) avaliando três antagonistas (*Streptomyces setonii*, *Bacillus cereus* e *Serratia marcescens*), e o ácido jasmônico, no controle também da mancha bacteriana do tomateiro causada por *Xanthomonas gardneri*, conseguiram obter reduções na severidade da doença em cerca de 29, 59 e 61% nas

aplicações em sementes com *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii* e ácido jasmônico. Indicando possibilidade de controle com esses antagonistas.

Outro aspecto importante que vem sendo considerado como meio de indução de resistência, que não está ligado ao uso de medidas alternativas propriamente ditas, é a utilização de produtos químicos com ação ativadora de proteínas relacionadas à patogênese. Itako et al. (2012) avaliou o agente indutor sintético acibenzolar-S-metil, fungicidas como fluazinam, piraclostrobina, piraclostrobina + methiran, oxicleto de cobre, oxicleto de cobre + mancozeb e o antibiótico oxitetraciclina no controle da mancha bacteriana do tomateiro (com agente causal a *Xanthomonas perforans*) e seu efeito na ativação das proteínas PRs. Através de análises da redução de severidade da doença detectaram que o agente indutor ASM e os fungicidas piraclostrobina e piraclostrobina + methiran são satisfatórios no controle da mancha bacteriana em tomateiro além elicitar incrementos nas atividades enzimáticas de peroxidases, polifenoloxidasas e β -1,3 glucanase.

2.2.4 Flagelina como agente de indução de resistência

Estudo relatado por MALIK et al. (2020) indicaram que plantas mutantes com baixa sensibilidade a molécula de flagelina não eram responsivas à infecção por bactérias, pois o receptor denominado FLS2 estava defeituoso. Esse mesmo receptor pode reconhecer epítomos bacterianos patogênicos e microorganismos benéficos de 22 aminoácidos denominados flg22, essa conexão entre receptores e moléculas elicitoras forma os complexos com outro receptor denominado BRI1, ativando inúmeras respostas de defesa vegetais (STRINGLIS e PIETERSE, 2021).

A percepção de flg22 pelo receptor FLS2 é capaz de ativar no citoplasma algumas vias MAP quissases em *Arabidopsis*, induzindo, por exemplo, a produção de espécies reativas de oxigênio, fluxos de íons, deposição de caloses e a expressão de genes relacionados a defesa vegetal (ZIPFEL et. al, 2004). Estudos de ZIPFEL (2009) indicaram que existem receptores homólogos ao FLS2 funcionais na cultura do tomate, *Nicotiana benthamiana* e no arroz. Este mesmo autor relata que esse receptor FLS2 contribui para o controle da mancha bacteriana, pois a ausência da flagelina em *Arabidopsis* levou a uma maior suscetibilidade a bactérias virulentas.

É importante salientar que o receptor Flg22 é baseado na via de transdução de sinal do ácido salicílico (SA) e também relacionado ao ácido jasmônico (JA) ou via de

transdução de sinal do etileno. As vias de sinalização SA e JA ativadas têm um efeito na geração de ROS e na deposição de calose desencadeada por Flg22 (ZHOU et al., 2021).

Nos estudos de Faillace et. al (2019) utilizando extratos brutos da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* indicaram eficiência na promoção de defesa vegetalem plantas de batata (*Solanum tuberosum*) contra *Pectobacterium* sp., com redução de até 60% dos sintomas da doença causada por *P. atrosepticum*.

2.2.5 Enzimas e genes relacionados a indução de resistência em plantas

As interações patógeno-hospedeiro induzem algumas alterações no metabolismo celular e nas atividades enzimáticas, incluindo a fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO), lipoxigenase (LOX), superóxido dismutase e β -1,3-glucanase (JAYANNA e UMESHA, 2017). Essas enzimas são capazes de aumentar atividade antimicrobiana, processos biossintéticos relacionados ao desenvolvimento da parede, lignificação, polimerização de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, e regulação do alongamento da parede celular.

A explosão oxidativa (ROS) é caracterizada por enzimas dos complexos oxidantes e antioxidantes, tais como: peroxidase (PO) e a polifenoloxidase (PO). Essas enzimas proporcionam respostas rápidas na contenção do patógeno, contudo, quando acumuladas tornam-se tóxicas à célula (MOLLER, 2001). A produção de ROS é detectada durante a ativação da imunidade desencadeada por PTI e imunidade desencadeada por efetor (ETI), podendo agir diretamente contra opatógeno ou contribuir para o processo de sinalização de barreiras físicas para contenção de patógenos (TORRES, 2010).

Nos estudos de O'Brien (2000) foram propostas três famílias de peroxidases de plantas: classe I, peroxidases procarióticas, peroxidase de citocromo C de levedura e peroxidases de ascorbato de plantas; classe II, peroxidases de fungos secretores; e classe III, peroxidases de plantas. Ainda segundo os trabalhos de O'Brien (2000), as peroxidases vegetais desempenham um papel no metabolismo da auxina, defesa extracelular contra patógenos e estresse, sendo induzidas por patógenos, ferimentos, calor, frio ou correntes de ar ou luz ultravioleta.

As peroxidases possuem características específicas e de caráter bifuncional no metabolismo oxidativo, utilizando o H_2O_2 para oxidar vários substratos por meio do

seu ciclo catalítico, produzindo o próprio peróxido de hidrogênio a partir de moléculas hidroxilas por meio do seu ciclo catalítico hidroxílico (PASSARDI, 2004). Contudo, as POX de parede celular podem promover o alongamento celular devido à produção de OH e a clivagem não enzimática dos polissacarídeos de ligação cruzada (LISZKAY, 2004).

Nos estudos de YOSHIDA et al. (2003) foram analisados para cultura do tomate 4 genes relacionados às peroxidases TPX1, TPX2, TAP1 e TAP2. Os autores descobriram que a superexpressão do gene TPX2 interferiu no desenvolvimento normal de crescimento e taxas de germinação de plantas transgênicas. Já os genes tap1 e tap2 codificantes das peroxidases aniônicas de tomate e batata foram induzidos por ferimentos, fungos, elicitores e ABA.

As PPOs estão frequentemente sendo relacionadas com as vias de defesa vegetal devido a sua indução após ferimentos, incidência de patógenos ou infestação de insetos, além de outros estresses abióticos (JUKANTI, 2017).

Na maioria dos tecidos vegetais, o aumento da abundância de transcritos e atividades de PPO em resposta aos ferimentos e hormônios vegetais, como systemina, ácido salicílico e os jasmonatos, sugere que os genes PPO são induzidos como parte de uma resposta não específica. E essas respostas podem ocorrer em interações planta-patógeno incompatíveis (resistentes), em interações compatíveis (suscetíveis), e em interações não hospedeiras (ZHANG e SUN, 2017).

A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), é uma enzima relacionada com as vias dos fenilpropanóides, catalizando a eliminação não oxidativa da amônia da PAL em ácido transcinâmico. É importante salientar que ácido salicílico pode ser acionado pelas rotas do fenilpropanóide e esse estabelecimento AS é crucial para o estabelecimento de respostas de defesa contra fitopatógenos. Além disso é observado que a superexpressão de genes PAL resultam em aumento substancial nos teores de lignina e a regulação negativa da PAL acarreta baixa respostas de defesa vegetal (QIN et al., 2022).

Nos trabalhos de TAKAKURA et. al (2008) foi evidenciado que a forte relação de genes de flagelina com a expressão da fenilalanina amônia-liase (PAL) com respostas de defesa em plantas de arroz transgênicas, de três a 5 vezes mais expresso que as plantas controle.

2.2.6 Técnica qPCR para análises de expressão gênica

A Reação em Cadeia de Polimerase, é uma metodologia que possibilita a confecção e síntese de fragmentos de DNA, através de enzimas específicas de polimerização (DNA-polimerase). A mesma técnica participa da replicação do material genético nas células. E o PCR em tempo real (qPCR) possibilita o monitoramento da replicação de DNA e a quantificação ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação (NOVAES e PIRES-ALVES, 2004).

Na PCR em tempo real a reação está sendo monitorada por um detector em tempo real por meio da descarga de fluorescência (utilizando fluoróferos específicos) à medida que progride a reação (ABDULAI et al., 2020). A investigação da expressão gênica é um passo inicial e essencial para entender a função de um gene em um contexto fisiológico (ABDALAH et al., 2016). As bases experimentais para realização das análises de expressão gênica em si pode ser exemplificado por DIE et al. (2016) que indicaram as bases experimentais para realização de um experimento. As etapas típicas são: (1) a amostragem de material e a extração do RNA; (2) a transcrição reversa para convertê-lo em cDNA; e, finalmente, (3) a amplificação do cDNA por qPCR.

Para observação da amplificação dos transcritos de cDNA, normalmente são utilizadas duas metodologias e podem ser agrupados em: Corantes fluorescentes não específicos de sequência de amplicon (por exemplo, SYBR® Green), que se liga a qualquer DNA de fita dupla (dsDNA) na reação, e métodos específicos de sondas ligantes nas sequências, baseiando-se nos oligonucleotídeos marcados com fluorescência, como Molecular Beacons ou Scorpions e 5' nuclease conhecidas como TaqMan DNA probes (ABDULAI et al., 2020).

Na fluorescência SYBR® Green, que é a medida mais usual, verifica após cada ciclo os níveis crescentes de fluorescência durante o qPCR, pois o fluorófero se liga aos fragmentos de cDNA de fita dupla de forma inespecífica. O valor do “ciclo de quantificação” (Cq) de uma execução de qPCR é usado para quantificação e reflete o ponto de tempo e o ciclo durante a fase de PCR exponencial em que um nível de limite definido de fluorescência verde SYBR é atingido (ABDALAH et. al, 2016).

As bases experimentais para realização das análises de expressão gênica em si pode ser exemplificado por DIE et al. (2016) que indicaram as bases experimentais

para realização de um experimento. As etapas típicas são: (1) a amostragem de material e a extração do RNA; (2) a transcrição reversa para convertê-lo em cDNA; e, finalmente, (3) a amplificação do cDNA por qPCR.

Para observação da amplificação dos transcritos de cDNA, normalmente são utilizadas duas metodologias e podem ser agrupados em: Corantes fluorescentes não específicos de sequência de amplicon (por exemplo, SYBR® Green), que se liga a qualquer DNA de fita dupla (dsDNA) na reação, e métodos específicos de sondas ligantes nas sequências, baseando-se nos oligonucleotídeos marcados com fluorescência, como Molecular Beacons ou Scorpions e 5' nuclease conhecidas como TaqMan DNA probes (ABDULAI et al., 2020).

Na fluorescência SYBR® Green, que é a medida mais usual, verifica após cada ciclo os níveis crescentes de fluorescência durante o qPCR, pois o fluoróforo se liga aos fragmentos de cDNA de fita dupla de forma inespecífica. O valor do “ciclo de quantificação” (Cq) de uma execução de qPCR é usado para quantificação e reflete o ponto de tempo e o ciclo durante a fase de PCR exponencial em que um nível de limite definido de fluorescência verde SYBR é atingido (ABDALAH et. al, 2016).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios nesse presente trabalho foram norteados, inicialmente, segundo investigações prévias relacionadas a redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro com o uso do produto elicitor a base de extrato bruto de flagelina. Esses ensaios foram conduzidos por Simões et al., (2021), realizando a prospecção de espécies de *Xanthomonas* spp., avaliando a capacidade eliciadora do extrato bruto de flagelina de 11 isolados e sua resposta de compatibilidade de doença com o tomateiro.

Os ensaios foram conduzidos em: testes de concentrações, análises de severidade, análises de enzimas relacionadas a defesa vegetal, análises de ciclo completo da cultura, análises da ocorrência natural do oídio do tomateiro, e análises laboratoriais de atividades diferenciais de enzimas e genes relacionadas a defesa vegetal. Os testes de concentrações, avaliação de severidade e ciclo completo da cultura foram conduzidos conforme padronização de condições de cultivo.

Os ensaios de testes de concentrações para ajustar a resposta mais adequada à redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro foram realizados com vasos de 0,5 L na mistura de argila, areia e matéria orgânica na proporção de 1:1:1.

As análises de clorofila para todos os ensaios foram realizadas segundo índices SPAD utilizando o medidor de clorofila, modelo SPAD-502 plus (Konica Minolta).

Para a realização dos ensaios com ciclo completo foram realizadas a correção da acidez potencial e suplementação nutricional a cada 30L de solo peneirado seguindo interpretação da análise de solo realizada pelo Laboratório de Qualidade do Solo - LQS pertencente à Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Unidade de Meio Ambiente), localizada na cidade de Jaguariúna-SP, seguindo o Método de extração Mehlich (SCHONINGER et al., 2012). A base teórica complementar para nortear a adubação foi retirada do boletim 100 do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC (RAIJ et al., 1997). As adubações de programadas no cultivo de tomate de fundação e cobertura foram realizadas nas plantas com a fórmula NPK 8-28-16.

As condições de cultivos das colônias utilizadas em todos os ensaios deste trabalho foram realizadas em meio Kado e Heskett 523 a 28°C/24h. Para a inoculação na planta em todos os ensaios, o patógeno *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) foi cultivado por 24 h a 28 °C. As células bacterianas foram centrifugadas por 10.000 g/20 min e suspensas em água destilada estéril até uma concentração final de $2,5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$.

2.3.1 Obtenção de extrato bruto de flagelina

Os extratos brutos de flagelos foram obtidos a partir de culturas distintas crescidas dos isolados selecionados de espécies de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (X-RR, código CMAA 1823), e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC5, código CMAA 1826) (SIMÕES et al., 2021) por 48 h em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) a 27°C para máxima produção de biomassa bacteriana. O crescimento bacteriano foi removido, suspendendo as células em tampão fosfato de potássio (20 mM, pH 7,4), ajustando a concentração para $2,5 \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1}$ (Abs 540 nm= 0,2) e centrifugando as células a 5700 g por 5 min. O pellet formado foi ressuspendido no mesmo tampão e homogeneizado em triturador de tecidos para liberação dos flagelos. Fragmentos celulares foram removidos por centrifugação (23400 g, 1h, 4°C). O sobrenadante foi, então, liofilizado para se obterem os flagelos, que foram mantidos a -20°C até o momento do uso (MEZIANE et al., 2005). Todo esse processo de extração

pode ser revisado nos arquivos em anexos de passo a passo escrito e ilustrado de obtenção do extrato bruto de Flagelos (arquivos suplementares 7 e 8).

2.3.2 Análise da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, teor de clorofila e determinação da atividade de peroxidase, polifenoloxidase e proteínas totais

Todos os ensaios foram realizados em condições controladas com delineamento inteiramente casualizado em esquema simples, com 2 elicitores (X-RR e XCC5) x 1 concentração x 10 repetições seguindo a conformidade de: Tratamento X-RR + patógeno, aplicação do elicitor X-RR apenas; Tratamento XCC5 + patógeno, aplicação do elicitor XCC5 apenas; Tratamento apenas com o patógeno e tratamento aplicando apenas água. A concentração padrão preliminar testada foi de 8,3 µg/ml. O tecido foliar foi coletado nos dias 0, 1, 4, 7 e 12 dias após a inoculação para extração de proteínas totais, análise da atividade de enzimas e genes relacionados a indução de resistência na defesa vegetal. O método de aplicação preliminar dos elicitores foram por via aérea, pulverizando-se o tecido foliar até o ponto de escorrimento.

A severidade foi estimada com escala diagramática de Mello et al., (1997) nos dias 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 e 17 após inoculação com o patógeno. Os resultados de severidade para cada período foram analisados por meio do pacote de software R realizando-se comparação entre médias dos tratamentos em que tenha inoculação com o patógeno, pelo teste LSD a 5% de significância.

Para a determinação dos teores de clorofila foram realizadas leituras com intervalos de 2 dias para cada tratamento. As leituras foram realizadas nos períodos mais frescos do dia (por volta das 8h às 9h 30min), analisando o folíolo apical da primeira folha composta expandida abaixo do ápice da planta. Os resultados foram analisados utilizando-se os dados quantitativos representados por índices SPAD (MARTÍNEZ et al., 2017), por meio do pacote de software R realizando-se comparação entre médias dos tratamentos pelo teste LSD a 5% de significância.

2.3.3 Avaliação de atividade enzimáticas: obtenção do extrato bruto

As amostras de folhas de tomate (0,5 g) foram coletadas e acondicionadas em freezers -80 °C até o momento de uso. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 5 mL de tampão de acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e nitrogênio

líquido, com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana até a obtenção de massa homogênea, centrifugada à 10.000 rpm durante 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática POX, PPO e a quantificação de proteínas totais.

2.3.4 Reações de peroxidase e polifenoloxidase

A montagem das reações para avaliar a atividade POX, foram realizadas em 20 µL de extrato vegetal, 70 µL de tampão fosfato de sódio (0,01 mol L⁻¹, pH 6,0), 70 µL de guaiacol (15 mmol L⁻¹) e 70 µL de peróxido de hidrogênio (mmol L⁻¹). A mistura foi incubada a 30 °C (HAMMERSCHMIDT et al., 1982) e as leituras de absorbância (470 nm) foram feitas a cada 10 s por 3 min. A atividade da PPO foi determinada usando uma mistura de 100 µl de solução de pirocatecol (20 mmol L⁻¹ em tampão fosfato de sódio a 0,1 mol L⁻¹, pH 6,8) e 20 µl de extrato vegetal, incubado a 30 °C (Duangmal e Apenten, 1999). As leituras foram feitas (420 nm) a cada 30 s por 31 min.

2.3.5 Quantificação de proteínas totais

O teste de Bradford foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras (BRADFORD, 1976). Uma curva de padronização dos dados foi preparada com a solução de soro bovino – BSA albumina nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500 µg. mL⁻¹ dissolvido em água Milli-Q, utilizando cubetas de vidro de 2 mL com o branco sendo apenas H₂O e Bradford com duas repetições para cada ponto da reta.

O teor de proteína para cada atividade enzimática lida, foi estimada misturando 20 µL de extrato bruto da folha a 200 µL de solução de Bradford (Sigma B6916), diluída 4:6, com medidas de absorbância em 595 nm. Cada reação foi realizada duas vezes, e as leituras foram feitas em um leitor de microplacas Tecan com controle de temperatura e um software de análise de dados Magellan™. Os dados foram expressos como alterações em unidades de absorbância por minuto por µg de proteína. As atividades enzimáticas de POX e PPO foram avaliadas foram submetendo-se ao teste F ($P \leq 0,05$) e usando pacotes de software R, comparando as médias de tratamento para tratamento pelo teste LSD a 5% de significância.

2.3.6 Atividade diferencial dos genes das melhores respostas dos tratamentos na redução da severidade da doença

As coletas para análise das expressões gênicas foram realizadas em três momentos: 4, 7 e 12 dias após a inoculação do patógeno. Todos os períodos de coletas foram realizados fora de picos de temperatura e umidade, escolhendo-se o período da manhã nas horas mais frescas. As coletas foram realizadas usando recipiente com isolamento térmico, envelopes pré-identificados de alumínio e cerca de 2 litros de nitrogênio líquido para o transporte das amostras até os freezers -80 °C para longas armazenagens.

Três genes codificantes a enzimas relacionadas à defesa vegetal foram selecionados de acordo com estudos anteriores de atividade enzimática após a aplicação do extrato bruto de flagelina em plantas com base em resultados de testes anteriores neste trabalho. As enzimas foram: polifenol oxidase (PPO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (PAL).

Os melhores tratamentos foram selecionados dos experimentos anteriores para confirmar a atividade elicitora, e que não proporcione uma interferência direta nos níveis de clorofila, sendo capaz de reduzir da severidade da doença. Para cada condição experimental, três amostras de RNA independentes foram usadas para validar a expressão gênica. Os cDNAs foram usados como modelo de qPCR quantitativo e serão produzidos usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Número de catálogo: 4368814). A qPCR quantitativa foi realizada usando os kits qPCR: GoTaq® qPCR e qPCR Systems Promega (Número de catálogo: A6001). Cada reação de qPCR em tempo real (20 µL) incluiu 50 ng de cDNA, 0,3 µM de cada primer e XSYBRGreen PreMix. Todas as reações foram realizadas em três réplicas técnicas nos sistemas StepOne e StepOnePlus Real-Time PCR sob as seguintes condições: 95 °C por 15 min e 40 ciclos de 95 °C por 10s, 55 °C por 30s e 72 °C por 32s para determinar a nível de fluorescência e para calcular os valores de limiar de ciclo (Ct), seguido de incrementos de 0,5 °C por 5s ao longo de um gradiente de 65°C a 95 °C. As curvas de Melting foram obtidas para garantir a expressão relativa do gene de especificidade do primer. O nível foi obtido por comparação com tomate não tratado após normalização com um gene de referência.

2.3.7 Teste de concentração com extrato bruto de flagelina para ajuste de concentrações

As doses utilizadas para os ensaios de ajustes de concentrações foram fracionadas de acordo com experimentos anteriores do grupo de pesquisa do laboratório de microbiologia ambiental (LMA) da Embrapa - Meio Ambiente. Os ensaios seguiram, portanto, em condições controladas com parcelas completamente casualizadas em um esquema simples com 1 elicitor a base de Flagelina pré-selecionada x 4 concentrações x 10 repetições. As concentrações testadas foram: 16,7, 8,35, 4,17 e 2,08 µg/ml.

As avaliações das respostas das contrações em relação a severidade da mancha bacteriana do tomateiro foram realizadas estimando-se a severidade da doença por meio da escala diagramática descrita por Mello et al. (1997) aos 7, 9, 12, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno. Os teores de clorofila foram medidos por leituras periódicas com intervalos de 2 dias para cada tratamento. As leituras foram realizadas nos períodos mais frescos do dia (por volta das 8h às 9h 30 min) da manhã, no folíolo apical da primeira folha composta expandida abaixo do ápice da planta.

Os resultados foram analisados utilizando-se os dados quantitativos representados por unidades SPAD (MARTÍNEZ et al., 2017), por meio do pacote de software R realizando-se comparação entre médias dos tratamentos para cada dia de avaliação pelo teste LSD a 5% de significância.

2.3.8 Avaliação de respostas agronômicas de elicitores e tecnologias de aplicação

Os ensaios com ciclo completo da cultura foram realizados em cultivo protegido, no setor de campos experimentais I da Embrapa – Meio Ambiente. A condução experimental foi realizada em vasos com capacidade de 10 litros cada, e o espaçamento foi de 1,0 m entre linhas x 0,8 m entre plantas.

O delineamento experimental escolhido foi o inteiramente casualizado - DIC em esquema factorial. Os fatores podem ser agrupados em: plantas inoculadas e não inoculadas com Xep; três métodos de aplicação do agente elicitor (pulverização com ponta cônica vazia - PCV ; pulverização com ponta cônica vazia + ação eletrostática – PCVe e aplicação via solo) x três regimes de aplicação (aplicação na fase vegetativa x aplicação no início do florescimento e aplicação no início da frutificação) com 5

repetições + 2 tratamentos adicionais: aplicação de água e tratamento apenas com aplicação *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Os tratamentos via modo de pulverização foram aplicados até o ponto de escorrimento das gotículas nas folhas do tomateiro, e as aplicações via solo foram realizadas próximas ao colo da planta em cerca de 5 mL por vaso do elicitor a base de extrato bruto de flagelina.

As plantas foram inoculadas um dia após a 1º aplicação do agente elicitor com uma suspensão de Xep a $2,5 \times 10^8$ mL⁻¹. A severidade foi estimada com escala diagramática por Mello et al., (1997) realizadas com total de 10 leituras, em intervalos de 2 dias até a 5ª leitura (respectivamente: 12, 14, 16, 18 e 20 dias após inoculação do patógeno). Após este período os tempos para avaliação foram ajustados conforme o progresso da doença (23, 25, 32, 35 e 39 dias), encerrando as avaliações no 39º dia após a inoculação do patógeno.

Os teores de clorofila foram determinados realizando 10 leituras programadas, no mesmo período das avaliações de severidade. As leituras foram padronizadas sendo realizadas no período da manhã (por volta das 8h às 9h 30min), escolhendo-se o folíolo apical da primeira folha composta expandida abaixo do ápice das plantas de tomate. Os resultados foram analisados usando dados quantitativos representados por unidades SPAD (MARTÍNEZ et al., 2017).

Parâmetros de produtividade e agronômicos foram analisados para relacionar a influência da aplicação do agente elicitor x severidade da doença da mancha bacteriana do tomateiro em cultivos comerciais. Portanto, as análises de produtividade foram: o peso total dos frutos por planta (PTF), o número de frutos totais (NTF) e o número de frutos comerciais (NFC). Os frutos comerciais seguiram a classificação disponível Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1995) que descreve e classifica as características mínimas dos frutos para a cultura do tomateiro.

Os parâmetros agronômicos foram: como altura da planta, biomassa da parte aérea (BARF), biomassa da raiz (BRAFR) e o teor de brix dos frutos colhidos. O teor de brix foi avaliado por representantes de frutos de cada planta Fruto (1 por cacho), com 3 repetições técnicas realizadas utilizando o refratômetro de Bolso Digital Hand-HELD XDRB0, 0,0-53,0% BRX., modelo XDRB0-53.

As análises estatísticas foram realizadas de maneira global para cada parâmetro agronômico ou de produtividade no esquema fatorial indicado acima, realizando o desdobramento do tratamento, quando aplicável, usando pacotes de software R,

comparando as médias de tratamento para cada dia de avaliação pelo teste LSD a 5% de significância.

2.3.9 Análise do controle do oídio de ocorrência espontânea, no tomateiro

No período de inverno paulista, as condições ambientais favoráveis propiciaram uma intensa epidemia de oídio do tomateiro, que ocorreu especificamente na fase de florescimento. Devido à essa ampla ocorrência do oídio, a intensidade da doença foi avaliada por meio de uma escala diagramática proposta por Lage (2012). Essa segunda análise foi realizada relacionando-se também as análises agronômicas e de produtividade descritas no item anterior, nos mesmos moldes: com análise fatorial em DIC, usando o pacote do software R, comparando o tratamento pelo teste LSD a 5% de significância.

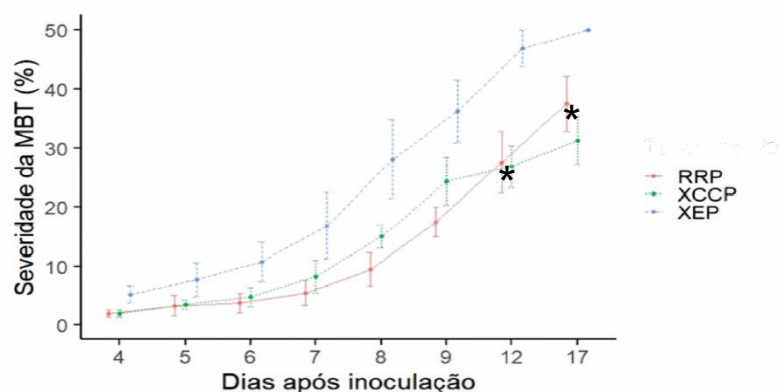
As avaliações de severidade para o oídio do tomateiro foram realizadas em 5 datas; 50, 52, 53, 54 e 104 dias após a inoculação da *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* no tomateiro, que foi o patossistema de estudo pré-estabelecido.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de severidade nos reforçam a capacidade de “antecipação” das respostas de defesa pela planta ao conseguir reconhecer os compostos brutos de flagelina (Figura 1), pois, como podemos verificar no tratamento aplicado apenas com a *Xanthomonas* sp., onde a planta parece reconhecer o patógeno mas de maneira menos intensa e dias depois em comparação aos tratamentos com elicitores + patógeno. Ambas as fontes de elicitores constituídos de flagelina conseguiram reduzir consideravelmente as porcentagens de severidade da mancha bacteriana, com leves diferenças para o extrato bruto da X-RR que apresentou um reconhecimento com as plantas de tomate de forma mais antecipada, fomentando indícios de diferenciação das rotas metabólicas acionadas e atividades enzimáticas.

Figura 1 – Avaliação da severidade da mancha bacteriana do tomateiro após aplicação dos elicitores a base dos extratos brutos de flagelina. MBT = Mancha bacteriana do tomateiro, RRP= Elicitor RR + aplicação do patógeno, XCCP = Elicitor XCC + patógeno, XEP = Aplicação apenas do patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*). Asteriscos * indicam diferença significativa entre os tratamentos com elicitores e o tratamento aplicado apenas com o patógeno.

As diferenças significativas foram encontradas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade para X-RR a partir do 9º dia após a inoculação, e a partir do 12º dia após a inoculação para XCC

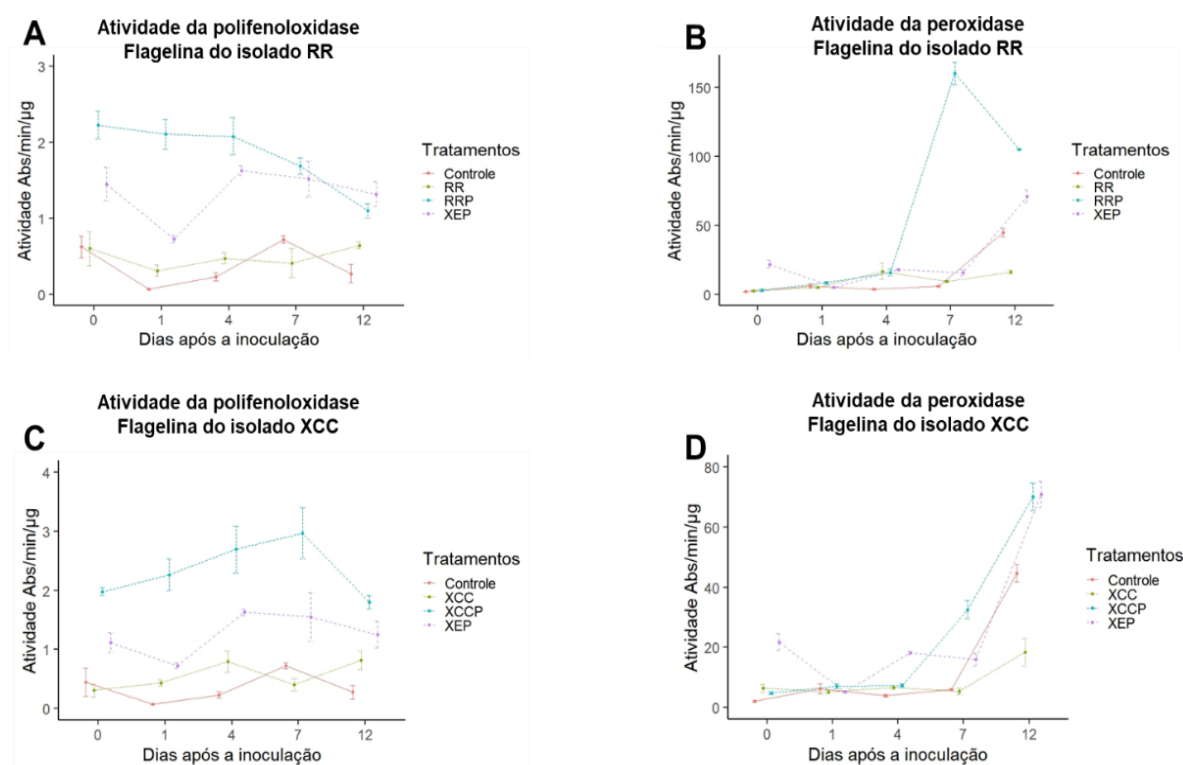


Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

Na figura 2 podemos observar que houve diferença significativa para o elicitor X-RR na atividade peroxidase no 4 a 7º dia após a inoculação em comparação ao

controle (Gráfico B). A atividade do polifenol oxidase atingiu o pico no dia 1 e os outros tratamentos foram estatisticamente semelhantes ao controle (Gráfico A). O elicitor XCC5 mostrou alta atividade da peroxidase a partir do dia 7 após a inoculação (Gráfico D), enquanto que a atividade polifenol oxidase foi verificada até o 7º dia, decaindo sua atividade este período (Gráfico C).

Figura 2 – Avaliação das atividades enzimáticas após aplicação dos elicitores a base dos extratos brutos de flagelina. RRP= Elicitor proveniente do isolado RR + Plantas somente inoculadas com o patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*), XCCP = Elicitor proveniente do isolado XCC + patógeno, XEP = Plantas somente inoculadas com o patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*). As diferenças significativas foram encontradas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

Os resultados de atividade da enzima peroxidase nos indica em ambos elicitores estudados, uma elevação mais tardia da atividade das peroxidases em relação a produção de compostos relacionados a polifenol-oxidase. Isso de fato, pode ocorrer pois é uma característica dominante das mudanças metabólicas que ocorrem durante

as fases iniciais do estabelecimento da doença na interação suscetível (TORRES, 2010). Além disso, as peroxidases podem ser um fator de preocupação no campo da agricultura devido ao seu efeito deletério no crescimento edesenvolvimento das plantas (KIDWAI et al., 2020). Por isso, estudos relacionados aos impactos da indução de resistência foram mais apurados nesse trabalho, relacionando melhores respostas de doses do elicitor quanto a severidade de doença, parâmetros agrônômicos e de produtividade da cultura do tomateiro.

As polifenoloxidasas ou tirosinases (PPO) são enzimas com um centro de cobre binuclear, que são capazes de inserir oxigênio em uma posição orto- para um grupo hidroxila existente em um anel aromático (MAYER, 2006) caracterizando a formação de compostos fenólicos que se acumulam, e que têm papel importante na defesa vegetal. Nesse estudo, podemos verificar que a alta atividade da polifenoloxidase foi aumentada antes da atividade da peroxidase, visto que a atividade dessa enzima está mais relacionada com alterações nos processos oxidativos para contenção dos patógenos, produzindo compostos fenólicos nocivos aos microorganismos, construindo barreiras físicas contra os patógenos (MOHAMMADI e KAZEMI, 2002). Isso faz com que, a resposta de defesa seja contra a mancha bacteriana do tomateiro, impedindo ainda em sua fase inicial de infecção do patógeno.

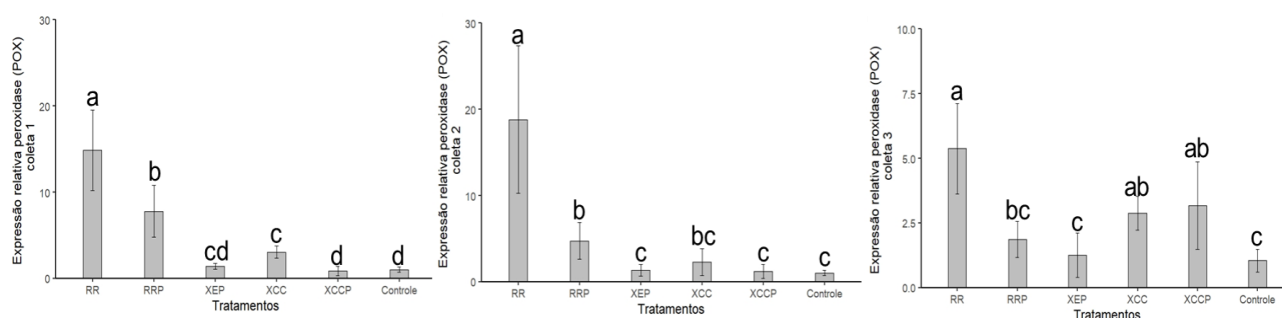
A *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, por sua vez está dentro do grupo de fitobactérias hemibiotróficas dependentes de sistemas de secreções de enzimas do tipo III e VI, induzindo a morte celular (KRAEPIEL e BARNY, 2016) e estabelecendo o sucesso de infecção na filosfera do tomateiro (LIYANAPATHIRANAGE et al., 2022). O que reforça a necessidade de mudanças de acionamento das vias metabólicas para melhor eficiência de contenção do patógeno durante todo o processo de infecção.

Nas figuras 3, 4 e 5 podemos observar os resultados para as atividades diferenciais de genes relacionados a defesa vegetal; POX, PPO e PAL. Na figura 3 observamos os resultados para a peroxidase III nos três momentos de coletas (4, 7 e 12 dias após a inoculação do patógeno). Houve diferença significativa para o elicitor X-RR + patógeno na expressão de genes nos dias 4 e 7 (1º e 2º coleta) após a inoculação do patógeno em comparação ao tratamento controle.

No décimo segundo dia (3º coleta), o tratamento X-RR + patógeno diminui sua atividade e seus resultados não diferiram dos demais tratamentos aplicados, exceto pelo tratamento aplicado apenas com o elicitor X-RR.

O elicitor XCC5 para expressão do gene POX não obteve resultados significativos em comparação ao tratamento controle em todos os dias de coleta. Esses resultados podem ser comparados com os resultados de atividade enzimática apresentadas no quadro de figuras 2. Podemos observar que em ambas as análises foi intensa expressão ou atividade nos dias 4 e 7, diminuindo logo em seguida até o dia 12, ao qual os tratamentos se comportaram semelhantes ao controle.

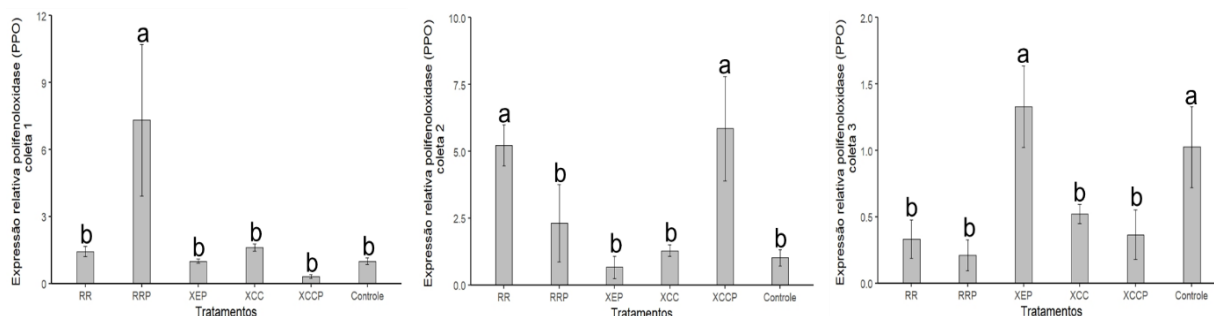
Figura 3 – Avaliação da expressão relativa do gene POX (peroxidase) após aplicação dos elicitores a base dos extratos brutos de flagelina. RRP= Elicitor proveniente do isolado RR + Plantas somente inoculadas com o patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*), XCCP = Elicitor proveniente do isolado XCC + patógeno, XEP = Plantas somente inoculadas com o patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*). As diferenças significativas foram encontradas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

Assim, no aumento observado pode estar correlacionado com a participação deste gene na formação das barreiras defensivas na cultura do tomateiro elicitadas após a aplicação do extrato bruto de flagelina contra a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. Os genes POX têm diversas funções na resposta de defesa da planta: mediar a resposta de hipersensibilidade e contra-ataque ao patógeno (OROZCO-CÁRDENAS, 2001). Na figura 4 podemos observar os resultados para as atividades diferenciais de genes relacionados à polifenol oxidase. A expressão do gene relacionado a polifenol oxidase atingiu o pico no dia 4 (coleta 1) para o elicitor X-RR+ patógeno, com os outros tratamentos estatisticamente semelhantes ao controle. O elicitor XCC5 mostrou alta expressão do polifenol oxidase no dia 7 após a inoculação (coleta 2), decaindo a expressão do gene após isso.

Figura 4 – Avaliação da expressão relativa do gene polifenoloxidase (PPO) após aplicação dos elicitores a base dos extratos brutos de flagelina. RRP= Elicitor proveniente do isolado RR + aplicação do patógeno, XCCP = Elicitor proveniente do isolado XCC5 + patógeno, XEP = Plantas somente inoculadas com o patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*). As diferenças significativas foram encontradas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade

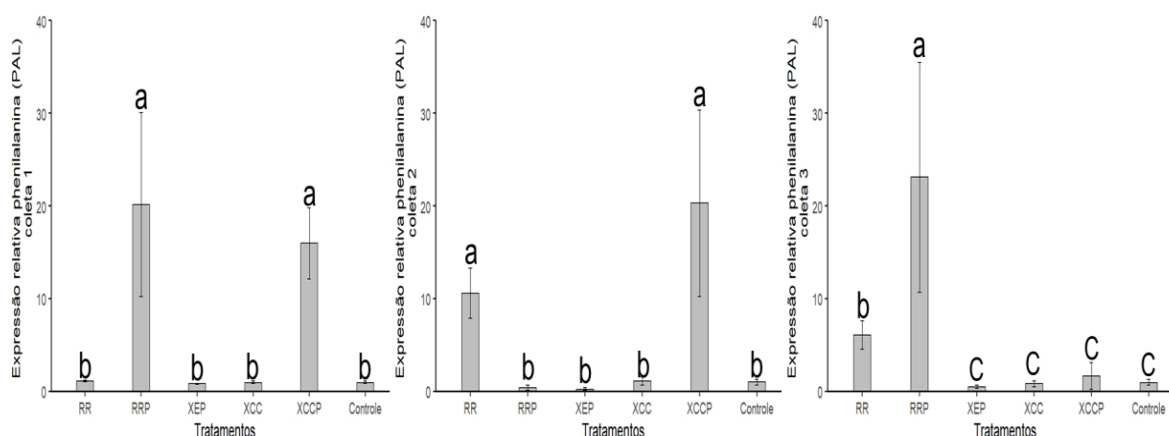


Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

Esses resultados também estão de acordo com os resultados mostrados para a atividade enzimática, visto que a alta expressão é verificada até esse período da coleta 2, decaindo muito após isso. A expressão dos genes que codificam a enzima é dita na literatura como muito específica do tecido e também controlada pelo desenvolvimento da planta (MAYER, 2006). Além disso, percebe-se que as plantas expostas ao elicitor foram capazes de aumentar a expressão da PPO antes do tratamento somente inoculado com o patógeno, convergindo com dados na literatura que indicam os níveis de atividade da PPO tenderem à aumentar quando a planta é infectada pelo patógeno (Ngadze et al., 2012). Essa resposta mais cedo pode ter ajudado a planta a conter o processo de infecção.

Na figura 5 observamos a expressão diferencial de genes relacionadas a enzima PAL. Para o elicitor X-RR + aplicação do patógeno houve uma oscilação na alta expressão do gene, visto que no dia 4 (1º coleta) obteve resultados altamente expressos, paralisando no dia 7 (2º coleta), voltando os picos de expressão no dia 12 (3º coleta). Neste sentido podemos indicar a presença de um trade-off na expressão de genes, já que nesse período ocorreu a expressão diferencial da peroxidase em relação aos demais tratamentos. Retornando essa expressão justamente quando os níveis de expressão da POX decaíram consideravelmente.

Figura 5 – Avaliação da expressão relativa do gene fenilalanina amoníaco-liase (PAL) após aplicação dos elicitores a base dos extratos brutos de flagelina. RRP= Elicitor proveniente do isolado RR + aplicação do patógeno, XCCP = Elicitor proveniente do isolado XCC5 + patógeno, XEP = Plantas somente inoculadas com o patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*). As diferenças significativas foram encontradas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

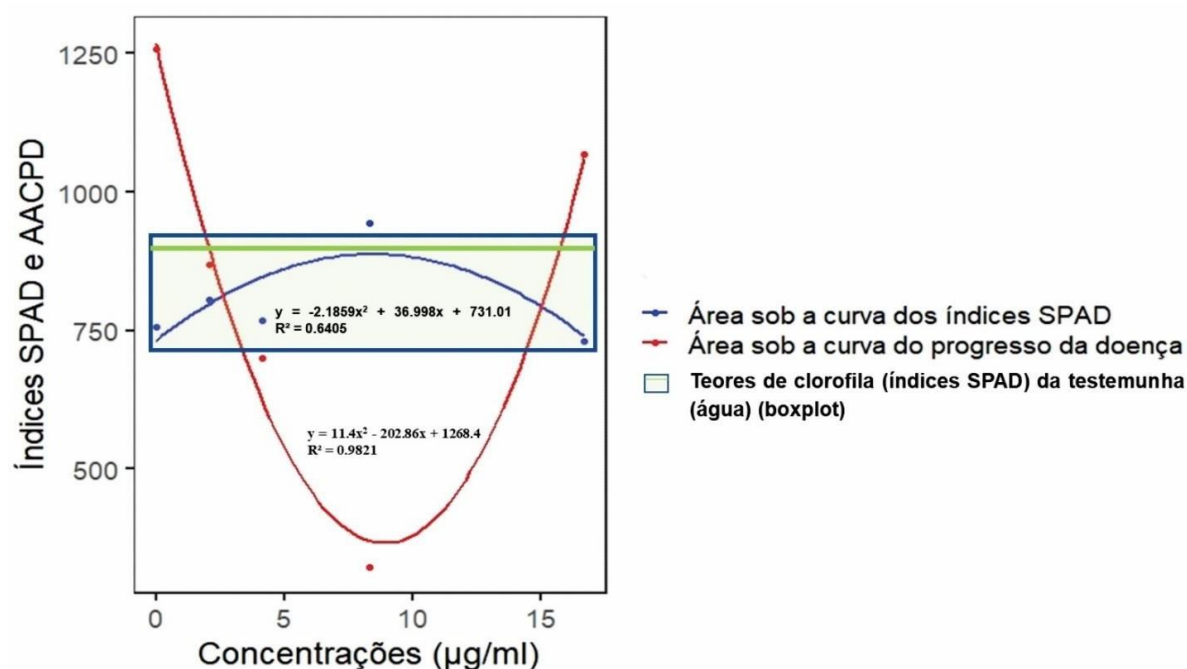
Já o elicitor XCC5 + aplicação do patógeno manteve níveis altos de expressão da PAL nos dias 4 e 7 (1º e 2º coleta), diminuindo drasticamente após isso. Podendo ser considerada uma mudança de rota metabólica para melhor eficiência no controle da mancha bacteriana do tomateiro. A PAL é a principal enzima envolvida na via biossintética dos fenilpropanóides, responsável pela produção de compostos fenólicos como flavonóides, fitoalexinas, ligninas e derivados do ácido benzóico (TAKAKURA et al., 2008). Todos esses capazes de agir na defesa contra fitopatógenos, o que reforça a correlação da alta expressão desse gene nos momentos de infecção e tentativa de colonização da *Xanthomonas* sp., já que esse patógeno passa por fases biotrófica e necrotrófica para suprir suas necessidades metabólicas.

As análises dos testes de concentrações apresentadas na figura 6 indicaram a menor intensidade da doença estimada para uma concentração de 8,9 µg/mL do elicitor X-RR selecionado dos ensaios anteriores, que de acordo com o modelo quadrático ajustado, é a concentração mais adequada, pois proporciona menor severidade da doença em contraste com maiores teores de clorofila. Porém, após

esse ponto de equilíbrio, o aumento das concentrações tendeu a elevar a severidade da mancha bacteriana e reduzir o teor de clorofila.

Um teste de correlação de pearson foi aplicado para analisar o balanço de concentrações e severidade da doença. Os resultados indicaram uma correlação negativa ($r=-0.85$) entre os dados de clorofila e severidade, de acordo com o aumento intensivo do uso do elicitor a base flagelina.

Figura 6 – Avaliação do efeito de diferentes concentrações de flagelina na severidade da mancha bacteriana do tomateiro e nos teores de clorofila das plantas aplicadas. As linhas do gráfico representam a análise de regressão das médias de AACPD e AUCC (Área sob curva de progresso da doença e Área sob a curva de clorofila)



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021.

Os efeitos deletérios da doença e a tendência da diminuição dos teores de clorofila com o aumento progressivo de concentrações de flagelina, reforça que os processos de sinalizações e transduções na defesa vegetal é demanda gasto energético, desviando mais intensamente as rotas metabólicas essenciais do metabolismo normal da planta. Isto é evidenciado uma vez que, após um limiar de

equilíbrio entre dose aplicada e redução de severidade houve mais respostas negativas do que efeitos positivos do estado de indução de resistência.

Nesse contexto é reportado na literatura que essa “percepção antecipada” do patógeno pelas plantas, através de componentes bacterianos aplicados, ajudam em ações imediatas como a geração das espécies reativas de oxigênio (ROS) e na ativação de respostas que levam ao fechamento estomático (BALMANT et al., 2021). Essa informação ajuda a associarmos aqui as enzimas e genes que modificam toda a “arquitetura” de funcionamento essencial das plantas para o acionamento sustentável e eficiente de rotas metabólicas contra microorganismos patogênicos.

As análises estatísticas para os ensaios com produção de tomate foram realizadas, a princípio, segundo a descrição da metodologia performando em fatorial triplo, selecionando um elicitor a base de flagelina, a X-RR, porém após essas análises prévias foram realizadas, análises secundárias em fatoriais duplos para cada agrupamento de significância. Nesse sentido, foram agrupadas em parâmetros agronômicos, parâmetros de produtividade e interação significativa entre fatores de acordo com a significância de cada tratamento. As análises seguiram usando o pacote do software R, comparando os tratamentos pelo teste de média LSD a 5% de significância.

Os fatores que apresentaram diferenças significativas para fatores principais ou interações foram: diferenças significativas apenas para tratamentos inoculados vs não inoculados (Fatorial duplo); os tratamentos com os modos de aplicação como fator único de significância (Fatorial principal); os tratamentos com o regime como fator único de significância (Fatorial duplo); tratamentos com interação entre os fatores inoculação vs modos de aplicação (Fatorial duplo).

O tratamento brix foi o único que não obteve diferença significativa já na realização do teste F, indicando que todos os tratamentos são iguais entre si para os teores de brix. Os parâmetros agronômicos área sob a curva de clorofila, biomassa fresca da parte aérea e biomassa fresca da raiz foram significativos quando comparadas plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno. Os teores de clorofila tenderam a diminuir nos tratamentos inoculados com a Xep, reforçando a presença de custos de alocação e toxicidade a própria planta. Custos estes que podem ser caracterizados pelas rotas metabólicas acionadas e pelas atividades diferenciais de enzimas e genes estudados nesse trabalho.

As interferências nos teores de clorofila especificamente são encontradas nessas resultantes interações planta-patógeno, pois alguns compostos relacionados à resistência são nocivos à planta e sua expressão continua pode impor uma carga metabólica significativa (HEIL e BALDWIN, 2002). Já os custos de alocação, vistos na tendência de menores pesos de biomassa fresca da parte aérea e da raiz, podem está ocorrendo, pois grandes quantidades de recursos limitantes de aptidão são direcionadas para características de resistência, essas alocações podem não ser redirecionadas rapidamente e, portanto, não disponíveis para processos de crescimento ou reprodução (DÍAZ-GALIANO et al., 2022).

Para as diferentes formas de aplicação do extrato bruto de flagelina, os parâmetros agronômicos altura de planta, biomassa da parte aérea e biomassa da raiz fresca sofreram influência do modo de aplicação, não diferindo estatisticamente no fator inoculação em relação aos diferentes modos de aplicação.

Na tabela 1 podemos observar que o modo de aplicação PCV foi o que proporcionou menores valores em todos os parâmetros, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos para altura de planta e BARF. O tratamento PCVe obteve desempenho intermediário para esses parâmetros, diferindo estatisticamente dos modos PCV e via solo. Esses resultados reforçam as características eletrostáticas de melhor distribuição de gotas nos alvos, maior área de contato (CHAIM et al., 2002) e de exposição ao produto elicitor. Ocasionalmente em nossos ensaios um período maior de exposição das plantas, estimulando de forma contínua a produção e ação dos compostos de defesa vegetal.

O modo de aplicação via solo diferiu estatisticamente dos demais proporcionando os maiores valores de altura de planta e BARF, porém nenhum dos modos de aplicação foi significativamente diferente entre si para o tratamento BRAF. Os resultados para o modo via solo nos indicando uma maior disponibilidade de receptores que “percebem” os elicitores, já que esses componentes aplicados no solo próximo a região da rizosfera também são capazes de serem reconhecidos pelas plantas como um sinal de incidência de patógenos, iniciando processos de acionamento de rotas metabólicas envolvidas como hormônios vegetais e compostos de defesa. Essas interações de reconhecimento, quando ocorridas no solo, são capazes de mudanças mediadas pelas plantas na microbiota do solo e nas vias hormonais, manipulando ácidos jasmonatos e ácido salicílico alterando o desenvolvimento da planta (HEINEN et al., 2020).

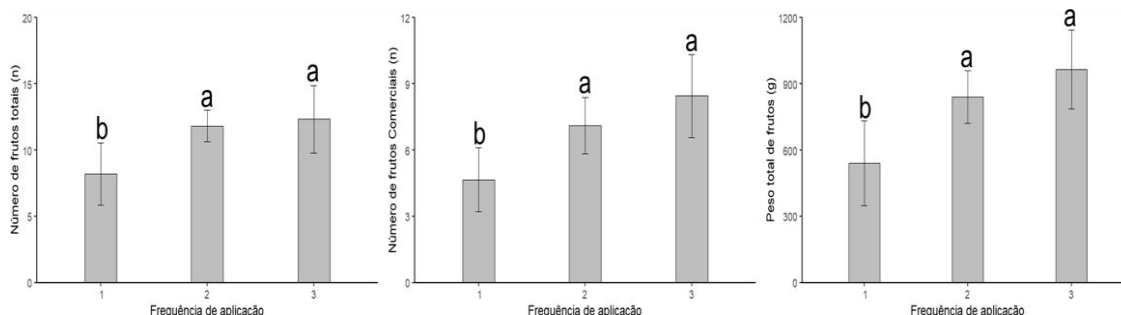
Tabela 1 – Análise dos modos de aplicação do elicitor proveniente do isolado RR do em função dos parâmetros agrônômicos

Tratamentos	Biomassa (g)		
	Altura de planta (m)	BARF	BRAF
PCV	1,34 B	104,15 B	5,35 A
via solo	1,46 A	208,63 A	7,38 A
PCVe	1,39 B	164,61 A	8,78 A
CV	2,82	13,06	14,22

As médias das diferenças são entre linhas, BARF = biomassa da área foliar, BRAF = biomassa seca da raiz. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 2021. *Dados transformados em raiz quadrada.

Os parâmetros de produtividade: número de frutos totais, peso de frutos totais e número de frutos comerciais foram afetados pelo regime de aplicações do extrato bruto de flagelina. É observado na figura 7 os parâmetros de produtividade que plantas com aplicação única, independentemente do modo de aplicação, obtiveram menores valores nos parâmetros lidos, diferindo estatisticamente de duas e três aplicações. Contudo, duas e três aplicações não diferiram estatisticamente entre si.

Figura 7 – Análise dos parâmetros produtividade versus regime de aplicação. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste LSD a 5% de probabilidade



Fonte: O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 4.1.0 2021

Na análise dos parâmetros de produtividade quanto a regime de aplicação podemos relacionar os custos de alocação de defesa vegetal como um fator importante para elucidarmos os resultados apresentados. Apesar da aparente tendência de aumento de todos os parâmetros de produtividade com duas e três aplicações do extrato bruto de flagelina, os “ganhos” não são significativos para um

aumento progressivo das aplicações. Sugerindo mais uma vez que há necessidade de equilíbrio entre produção de compostos de defesa e compostos para o crescimento, reprodução da planta. Além disso, hormônios vegetais relacionados a defesa e ao crescimento da planta, em condições naturais são autoregulados com aumento da concentração de um em detrimento do outro.

Nos estudos de Huot et al. (2014) é indicado que o ácido salicílico (AS), pode regular em alguns casos, a supressão da sinalização de auxinas, hormônio vegetal apontado como responsável pelo crescimento da planta. Isso reforça os dados apresentados de expressão gênica nesse trabalho, onde podemos verificar alta expressão de genes relacionadas com as rotas do ácido salicílico, o que provavelmente está interferindo com os resultados e indicando nos gráficos duas aplicações como limiar de equilíbrio entre a defesa e desenvolvimento vegetal.

Os tratamentos que sofreram influência da interação entre o fator inoculação e modo de aplicação foram: BRAS (biomassa seca das raízes), BARS (biomassa seca da parte aérea) e PTF (Tabela 2). Analisando cada tratamento de forma individualizada, verificamos que o tratamento BRAS não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com a Xep e as plantas não inoculadas. Dentro de cada modo de aplicação apenas o modo PCV foi diferente significativamente dos demais para as plantas não inoculadas. Para o parâmetro BARS só houve diferença significativa para as plantas inoculadas, com os modos de aplicação via solo e PCVe, uma vez que proporcionaram maiores desempenhos, não diferindo estatisticamente entre si. Já a interação entre os modos de aplicações e fator inoculação para PTF, houve diferença significativa apenas para os tratamentos não inoculados, com o modo PCV obtendo os menores resultados de peso total de frutos.

No contexto geral, a interação desses fatores acima, promoveu resultados interessantes principalmente para as plantas que foram inoculadas com a Xep. Já que os tratamentos via solo e PCVe obtiveram números próximos aos tratamentos não inoculados com a bactéria, para esses parâmetros estudados, não foram prejudiciais ao desenvolvimento da planta.

Tabela 2- Efeito dos modos de aplicação vs inoculação da *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* na biomassa de plantas de tomateiro e na produtividade

Tratamentos	BRAS		BARS		PTF	
	NI	I	NI	I	NI	I
PCVe	2,02 Aa	1,84 Aa	3,97 Ab	8,04 Aa	28,84 Aa	30,66 Aa
PCV	2,07 Aa	1,42 Ab	3,11 Ab	6,54 Ba	23,02 Ba	25,43 Aa
Solo	2,06 Aa	1,78 Aa	4,05 Ab	8,36 Aa	27,89 A	29,50 A
CV	1,23	13,93	17,10	13,93	8,06	9,52

NI = Não inoculado com a Xep, I = Inoculado com a Xep, Xep = *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, PCV = pulverização de cone vazio, PCVe = pulverização de cone oco + eletrostática, Solo = modo de aplicação pelo solo, BRAS = Biomassa seca da raiz, BARS = Biomassa seca da parte aérea, PTF = Peso de frutos totais. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas representam contrastes no sentido da coluna e minúsculas no sentido da linha. O teste de médias LSD foi realizado para comparar os tratamentos a 5% de probabilidade. *Todos os dados foram transformados em raiz quadrada. O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

As análises de severidade da doença após a aplicação do extrato bruto de flagelina na interação entre os modos e regime de aplicações indicaram que independente do modo de aplicação e do regime aplicada, estatisticamente os tratamentos foram iguais entre si. Na tabela 3, os resultados apresentam os modos de aplicação dentro de cada regime de aplicação em relação a testemunha. Todos os modos de aplicação foram eficientes na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, diferindo estatisticamente do tratamento controle.

Nesse estudo, podemos inferir o reconhecimento do extrato bruto de flagelina com a cultura do tomate, já que as ações de defesa vegetal foram acionadas de forma rápida e por várias rotas metabólicas como mencionado e discutido nos tópicos anteriores.

Dentro disso, podemos evidenciar um trabalho de Zhao *et al.*, (2020), suportando cerca de 22 aminoácidos identificados no núcleo do domínio conservado da flagelina bacteriana, que podem induzir a expressão de vários genes relacionados à defesa e desencadear todo esse aparato de desvio metabólico para defesa vegetal.

Tabela 3 – Intensidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro, após aplicação de flagelos, considerando a interação modo x regime de aplicação

Regime	Modos de aplicação			
	PCVe	PCV	Via solo	Testemunha
1 (22 DAT)	123,25 Ab	158,00 Ab	100,50 Ab	880,00 Aa
2 (34 DAT)	99,25 Ab	156,50 Ab	102,75 Ab	880,00 Aa
3 (79 DAT)	144,50 Ab	140,25 Ab	114,25 Ab	880,00 Aa
CV	25,92	22,07	39,58	-

DAT = Dias após o transplântio, Regime 1 = 22 dias após o transplântio, Regime 2 = 34 dias após o transplântio, Regime 3 = 79 dias após o transplântio. Letras maiúsculas representam contrastes para a coluna e minúsculas para a linha. Um teste de LSD médio foi realizado para comparar os tratamentos a 5% de probabilidade. *Dados AACPD transformados em raiz quadrada. O pacote estatístico utilizado foi o SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

As análises da redução severidade do oídio do tomateiro (*Oidium neolycopersici*) por ocorrência natural foram realizadas logo após a detecção dos primeiros sinais do fungo e da epidemia, que teve início no final da fase de florescimento. Impactando, principalmente, os dados de produtividade do tomateiro, nesse aspecto os modos de aplicação e as últimas aplicações do extrato bruto de flagelina foram importantes para variabilidade dos dados coletados e as diferenças significativas encontradas nesse estudo.

A quantificação da doença seguiu a escala diagramática proposta por Lage (2012), analisando os impactos na folha composta e folíolo separadamente. As análises estatísticas de severidade em folha composta e folíolos foram realizadas, primeiramente, com a análise de variância (ANOVA) que indicou através do teste F os níveis de significância. Os resultados indicaram para a severidade na folha composta e folíolo, os modos de aplicação e a regime como fatores principais de variabilidade dos dados. Assim, os resultados foram organizados em tabela única com os resultados confrontando modos vs regime de aplicação, realizando comparação de testes das médias pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Na tabela 4, podemos observar as diferenças entre os modos e os regimes de aplicação. Entre os modos de aplicações o método via solo foi o que proporcionou, em média, menores valores de severidade do oídio do tomateiro em todos os regimes de aplicações em relação ao tratamento controle para as folhas compostas.

Tabela 4 – Análise da interação entre Regime de aplicação vs modos de aplicação no controle do oídio do tomateiro

	Regime de aplicação – Folha			Regime de aplicação – Folíolo		
	1	2	3	1	2	3
PCV	499,25 BCa	46,83 Cb	768,16 Ba	618,87 Bca	121,91 Cb	941,50 Baa
PCVe	837,41 BAa	487,93 Bba	244,91 Cb	1073,83 BAa	873,83 Bba	373,13 Cb
via Solo	400 Ca	205 Bca	382 Ba	561,66 Ca	312,10 Ca	598,41Bca
Controle	1262,08 Aa	1262,08 Aa	1262,08 Aa	1536,16 Aa	1536,16 Aa	1536,16 Aa
CV	29,62	35,82	29,08	22,75	33,92	33,84

As letras maiúsculas representam as diferenças entre os tratamentos na coluna, valores numéricos representam a grandeza dos valores AACPD, ex: PCV = BC comparando a PCVe BA, e assim por diante. As letras minúsculas referem-se as comparações entre as Regimes 1, 2 e 3, ex: PCV com única aplicação (1) = a, compara-se a PCV com duas aplicações do elicitor (2) e assim por diante. Controle = Plantas somente inoculadas com o patógeno (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*), PCV = pulverização de cone vazio, PCVe = pulverização de cone vazio + eletrostática, Solo = modo de aplicação pelo solo. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes umas das outras pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. O pacote estatístico utilizado foi o software R versão 2021. *Dados transformados em raiz quadrada.

Já o método com cone vazio mais ação eletrostática não diferiu estatisticamente da testemunha com uma única aplicação, mas obteve redução nos valores de severidade da doença ao decorrer das duas últimas aplicações como observado na tabela, com melhor performance na última aplicação do extrato bruto de flagelina.

O método padrão PCV ou cone vazio proporcionou menores valores de severidade da doença, principalmente, com duas aplicações da flagelina. Para as análises de folíolo podemos observar na tabela 4, o método via solo diferindo estatisticamente dos demais em plantas com aplicação única do extrato bruto, e duas aplicações diferindo do método PCVe e da testemunha, comportando-se estatisticamente igual ao método padrão PCV. O método PCV, por sua vez, diferiu estatisticamente no grupo de plantas com duas aplicações, e o PCVe foi capaz de reduzir a severidade do oídio do tomateiro nas últimas aplicações do elicitor, obtendo reduções progressivas.

Nesse contexto geral, podemos observar que os efeitos das duas primeiras aplicações do extrato bruto de flagelina via solo foi mais eficiente, provavelmente, pelo aspecto de maior facilidade na percepção do elicitor nas raízes. Já que, logo após a segunda aplicação da flagelina, a epidemia de oídio apareceu de forma generalizada.

Esse ponto temporal da epidemia é fator importante que ajuda elucidar a capacidade de redução da severidade nesse grupo de plantas ser mais intensa como

método via solo, pois demonstra ter por características de reconhecimento e natureza de interação solo-planta uma ação mais prolongada.

Contudo, o método PCVe proporcionou maior redução com três aplicações pelos efeitos benéficos da indução de resistência acoplada à eficiência de aplicação com deposição de gota com menores perdas, nesse sentido além do fator indução, a característica da doença de necessidade de baixa umidade é superada, ajudando a diminuir a população de células propagativas do agente causal do oídio do tomateiro, com a aplicação adicional da terceira aplicação.

2.5 CONCLUSÕES

A aplicação do extrato bruto de flagelina foi eficiente na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro e no controle do oídio do tomateiro. Além de ativar enzimas e genes relacionados a defesa vegetal. Os melhores modos de aplicação para flagelina foram os métodos PCVe e via solo por proporcionarem maior redução da severidade das doenças estudadas associadas aos melhores índices agronômicos e de produtividade. Contudo, conclui-se que o método via solo pode ser recomendado por proporcionar equilíbrio nos resultados apresentados, com efeitos em índices agronômicos e de produtividade adequados. Além de necessitar uma aplicação a menos do produto elicitor em relação ao método PCVe na contenção do oídio do tomateiro.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMIAN, P.; JONES, J. B.; VALLAD, G. E. Efficacy of copper and copper alternatives for management of bacterial spot on tomato under transplant and field production. **Crop Protection**, v.126, p.104919, 2019a.
- ABDALLAH, H. B.; BAUER, P. Quantitative Reverse Transcription Qpcr Based Gene Expression Analysis in Plants. In: Botella, J., Botella, M. (eds) Plant Signal Transduction. **Methods in Molecular Biology**, v.1363. Humana Press, New York, NY, 2016.
- ABDULAI, M.; BASIM, H.; SABA, C. K. S. Rapid Identification and Detection of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, Causing Bacterial Blight Disease in Cassava by Real-Time PCR using LNA Probe. **International journal of agriculture & Biology**, v.23, p.259–268, 2020.
- ARAÚJO, E. R. *et al.* Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 159–168, 2017.
- BALMANT, K. M. *et al.* A proteômica redox das células Guard revela um papel da proteína de transferência de lipídios na defesa da planta. *Jornal de Proteômica*, v.242, 30 de junho de 2021.
- BARAK, J. D. *et al.* Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. **Front Plant Science**, v.7, p.1805, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**, 2022. Disponível em: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso: 20 de novembro de 2022.
- CARLOS, A. R.; LOPES, A. **Oídios do Tomateiro Comunicado Técnico 66**. ISSN 1414-9850, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103070/1/cot-66.pdf>. Acesso: 14/06/2022.
- CAVALCANTI, F. R. *et al.* Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis perniciosus*. **Biological Control**, v. 39, p. 408-417, 2006.
- CHAIM, A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L. Eficiência de deposição de agrotóxicos, obtida com bocal eletrostático para pulverizador motorizado costal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.497-501, 2002.
- CONSTANTIN, E. C. *et al.* Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v.65, p.792–806, 2016.

DE SÁ, G. N. V.; TEBALDI, N. D. Inactivated bacterial suspension to control tomato bacterial spot. **Tropical Plant Pathology**, v.47, p.583-589, 2022.

DÍAZ-GALIANO, F. J. et al. Use of high-resolution mass spectrometry for the first-time identification of gerberin as a tentative marker of the fraudulent organic production of tomatoes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.112, ISSN 0889-1575, 2022.

DIE, J. V. et al. Design and Sampling Plan Optimization for RT-qPCR Experiments in Plants: A Case Study in Blueberry. **Frontiers Plant Science**, v.7. p.271, Mar 7, 2016.

ENEBE, M. C.; BABALOLA, O. O. The impact of microbes in the orchestration of plants' resistance to biotic stress: a disease management approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, p.9-25, 2019.

GÖRLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates genes expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, v. 8, p.629-43, 1996.

FAILLACE, G. R.; SANTARÉM, E. R.; ASTARITA, L. V. Extrato de *Xanthomonas axonopodis* induz resistência em *Solanum tuberosum* contra *Pectobacterium atrosepticum*. **Biologic control**, v.134, p.53-62, 2019.

FERRAZ, H. G. M. et al. Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 4, p.417-427, 2015.

FURTADO, L. M. et al. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p.237-239, 2010.

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

HAJAM, I. A. et al. Flagelina bacteriana - um agente imunomodulador potente. **Experimental & Molecular Medicine**, v.49, p.373, 2017.

HEINEN, R. et al. Exogenous application of plant hormones in the field alters aboveground plant-insect responses and belowground nutrient availability, but does not lead to differences in plant-soil feedbacks. **Arthropod Plant Interactions**, v.14 (5), p.559-570, 2020.

HEIL, M.; BALDWIN, I. T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, v.7(2), p.61-67, 2002.

HUOT, B. et al. Growth defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. **Molecular Plant**, v.7, p.1267-1287, 2014.

JAKAB, G. *et al.* β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.07, p.29-37, 2001.

JAYANNA, S. K.; UMESHA, S. Enhancement of the expression of defense genes in tomato against *Ralstonia solanacearum* by N-octanoyl-L-homoserine lactone. **African Journal of Microbiology Research**, v.11, p. 194-203, 2017.

JUKANTI, A. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. ©Springer Nature Singapore ISBN 978-981-10-5747-2 (eBook), 2017.

JONES, J. B. *et al.* List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 925– 927, 2004.

KIDWAI, M.; AHMAD, I. Z.; CHAKRABARTY, D. Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. **Plant Cell Reports**, v.39(11), p.1381–1393, 2020.

KRAEPIEL, Y.; BARNY, M. A. Bactérias fitopatogênicas Gramnegativas, afinal todas hemibiotróficas?. **Molecular Plant Pathology**, v.17(3), p.313–316, 2016.

LANNA-FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.12, p.1381-1387, 2010.

LI, Y. **Powery Mildew of Tomato**. 04/2013. Disponível em: https://portal.ct.gov/-/media/CAES/DOCUMENTS/Publications/Fact_Sheets/Plant_Pathology_and_Ecology/POWDERYMILDEWOFTOMATO040113pdf.pdf?la=en. Acesso:14/06/2022.

LISZKAY, A.; VAN DER ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates (O_2 (center dot-), H_2O_2 , and (OH)-O-center dot) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology** 136: 3114-3123. 2004.

LIYANAPATHIRANAGE, P.; JONES, J. B.; POTNIS, N. Mutation of a Single Core Gene, tssM, of Type VI Secretion System of *Xanthomonas perforans* Influences Virulence, Epiphytic Survival, and Transmission During Pathogenesis on Tomato. **Phytopathology®** v.112(4), p.752–764, 2022.

LUNA-DIEZ, E. Using green vaccination to brighten the agronomic future. **Outlooks on Pest Management**, v.27(3), p.136–140, 2016.

MAPA, BRASIL. 1995. **Portaria Nº 553**, 30 de agosto. Norma de identidade, qualidade, acondicionamento, embalagem e apresentação do tomate. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/portaria+553_95_000gl3vxjrx02w x5ok0xkgq582yfj4l.pdf. Acesso: 27 de julho de 2022.

- MALIK, N. A. A.; KUMAR, I. S.; NADARAJAH, K. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. **International Journal Molecular Science**, v.21, p.963, 2020.
- MARTÍNEZ, F. *et al.* Influence of growth medium on yield, quality indexes, and SPAD values in strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v.217, p.17-27, 2017.
- MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? Are- view. **Phytochemistry**, v.67(21), p.2318–2331, 2006.
- MELLO, S. C.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Diagrammatic scale for evaluation of tomato bacterial spot. **Fitopatologia Brasileira**. v.22(3), p.447-448, 1997.
- MEZIANE, H. *et al.* Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v.6, p.177-185, 2005.
- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v.162, p.491-498, 2002.
- MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turn over, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.561-591, Sept. 2001.
- NGADZE, E. *et al.* Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. **Plant Disease**. v.96, p.86-192, 2012.
- NOVAES, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - Edição v.33 - julho/dezembro, 2004.
- O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v.129, p.113–139, 2000.
- OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. In **Plant Cell**, v.13(1), p.179–191, 2001.
- OSDAGHI, E. *et al.* A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. **Molecular Plant Pathology**, v.22(12), p.1500–1519, 2021.
- PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v.9, p.534- 540, 2004.
- QIN, Y. *et al.* A phenylalanine ammonia-lyase from *Fritillaria unibracteata* promotes drought tolerance by regulating lignin biosynthesis and SA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.213, p.574– 588, 2022.

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

RAIJ, B. V. *et al.* Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo. **Instituto Agrônomo/Fundação IAC**, ISSN: 0100-3100, 2 ed., p.184–185, 1997.

RESENDE, M. L. V. *et al.* Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v32, p.213-221, 2007a.

SCHONINGER, E. L.; GATIBONI, L. C.; LINHARES, D. Mehlich 3 method as substituent to the HCl method for extraction of Copper and Zinc in soils from Southern Brazil with high levels of organic matter. **Ciência Rural**, v.42, p.1200-1203, 2012.

SIMÕES, C. T.; CARVALHO, V. N.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Prospecting of pathogen-derived elicitors for the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Protection Research**, v.61(2), p.183–188, 2021.

STRINGLIS, I. A.; PIETERSE, C. M. J. Evolutionary “hide and seek” between bacterial flagellin and the plant immune system. **CELL Host & Microbe**, v. 29, p.448-450, 2021.

TAKAKURA, Y. *et al.* Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants. **Molecular Plant Pathology**, v.9(4), p.525–529, 2008.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, v.138, n.4, p.414–429, 2010.

VAUTERIN, L. *et al.* Reclassification of *Xanthomonas* sp. v.45, p.472–489, 1995.

YARIPOUR, Z. *et al.* Host range and phylogenetic analysis of *Xanthomonas alfalfae* causing bacterial leaf spot of alfalfa in Iran. **European Journal of Plant Pathology**, v.150, p. 267–274, 2018.

YOSHIDA, K. *et al.* Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Apply Microbiology Biotechnology**, v.60, p.665–670, 2003.

ZHANG, J.; SUN, X. Recent advances in polyphenol oxidase-mediated plant stress responses. **Phytochemistry**, v.181, p.112588, 2021.

ZHAO, S. *et al.* Expression of flagellin at yeast surface increases biocontrol efficiency of yeast cells against postharvest disease of tomato caused by *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 162, 2020.

ZIPFEL, C. *et al.* Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. **Nature**, v.428, p.764, 2004.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.414–420, 2009.

ZHOU, H. *et al.* Flagellin FLiC Enhances Resistance of Up land Cotton to *Verticillium dahliae*. **bioRxiv preprint**, 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Certamente a indução de resistência e a utilização de componentes bacterianos como agentes elicitores são fontes alternativas ascensão no mercado, pelo uso de extratos brutos bacterianos com baixa instabilidade e alta reprodutibilidade. Esse estudo fornece uma confirmação de eficiência na redução de severidade, melhor modo de aplicação e ajustes de concentrações que fornecem parâmetros importantes para direcionamento no uso dos elicitores a base de Lipopolissacarídeos e flagelos de *Xanthomonas* incompatíveis no controle da mancha bacteriana e oídio do tomateiro.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, H. B.; BAUER, P. Quantitative Reverse Transcription Qpcr Based Gene Expression Analysis in Plants. In: Botella, J., Botella, M. (eds) Plant Signal Transduction. **Methods in Molecular Biology**, v.1363. Humana Press, New York, NY, 2016.
- ABDULAI, M.; BASIM, H.; SABA, C. K. S. Rapid Identification and Detection of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, Causing Bacterial Blight Disease in Cassava by Real-Time PCR using LNA Probe. **International journal of agriculture & Biology**, v.23, p.259–268, 2020.
- ABRAHAMIAN, P., et al. Epidemiology, diversity, and management of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.105, p.6143-6158, 2021.
- ABRAHAMIAN, P.; JONES, J. B.; VALLAD, G. E. Efficacy of copper and copper alternatives for management of bacterial spot on tomato under transplant and field production. **Crop Protection**, v.126, p.104919, 2019a.
- ADHIKARI, P., et al. Advances and Challenges in Bacterial Spot Resistance Breeding in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p.1734, 2020.
- AGRIOS, G. N. Plant pathology. 15. Ed. Florida: **Elsevier Academic press**, 2005.
- ANA, L. A. B. **Expressão diferencial de genes induzidos por antracnose em feijoeiro em resposta à indução de resistência por silício**. TESE (DOUTORADO EM CIÊNCIAS) Centro de energia nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, p.172, 2012.
- ANDERSEN, E. J., et al. Disease resistance mechanisms in plants Genes. **Genes (Basel)**, v.9, p.339, 2018.
- ARAÚJO, E. R., et al. *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. **European Journal of Plant Pathology**, v.143, p.543–548, 2015.
- ARAÚJO, E. R. et al. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 159–168, 2017.
- ARDEBILI, Z. O., et al. The induced physiological changes by foliar application of amino acids in *Aloe vera* L. plants. **Plant Omics**, Brisbane, v.5(3), p.279–284, 2012.
- BAESSO, M. M., et al. Avaliação da uniformidade de distribuição volumétrica de bicos hidráulicos. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v.17(2), p.120-127, 2009.

BALMANT, K. M. *et al.* A proteômica redox das células Guard revela um papel da proteína de transferência de lipídios na defesa da planta. **Jornal de Proteômica**, v.242, 30 de junho de 2021.

BARAK, J. D., *et al.* Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. **Front Plant Science**, v.7, p.1805, 2016.

BARBOSA, A. S.; MEDEIROS, M. B. Potência de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência sistêmica vegetal. Porto Alegre-RS, **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1453-1457, out. 2007.

BARROS, F. C., *et al.* Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.231-239, 2010.

BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion Plant Biology**, v.7, p.391, 2004.

BLUME, B., *et al.* Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. **Plant Cell**, v.12, p.1425-40, 2000.

BOUBAKRI, H. Induced resistance to biotic stress in plants by natural compounds: Possible mechanisms. **Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants**, p.79-99, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**, 2022. Disponível em: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso: 20 de novembro de 2022.

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa, (Comunicado Técnico, 87), 2003.

CARLOS, A. R.; LOPES, A. **Oídios do Tomateiro Comunicado Técnico 66**. ISSN 1414-9850, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103070/1/cot-66.pdf>. Acesso: 14/06/2022.

CASABUONO, A., *et al.* Structural Analysis and Involvement in Plant Innate Immunity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Lipopolysaccharide. **The journal of biological chemistry**, v.286, p.25628-25643, 2011.

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

CHAIM, A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L. Eficiência de deposição de agrotóxicos, obtida com bocal eletrostático para pulverizador motorizado costal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.497-501, 2002.

CHÁVEZ-HERRERA, E., *et al.* Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 Lipopolysaccharides on Wheat Plant Development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.37(3), p. 859–866, 2018.

CHAIM, A. **Desenvolvimento de um pulverizador eletrohidrodinâmico: avaliação do seu comportamento na produção de gotas e controle de trips (*Enneothrips flavens* Moulton), em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal, p. 107, 1984.

CHAIM, A., *et al.* **Avaliação de perdas de pulverização em culturas de feijão e tomate**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, (Embrapa Meio Ambiente, Boletim de Pesquisa, 2), p.29, 1999a.

CHAIM, A.; LARANJEIRO, A. J.; CAPALBO, D. M. F. Bico pneumático eletrostático para aplicação de inseticidas biológicos em floresta de eucalipto. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente, (Boletim de Pesquisa, 3)**, p.33, 1999.

CHAIM, A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L. Eficiência de deposição de agrotóxicos, obtida com bocal eletrostático para pulverizador motorizado costal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.497-501, 2002.

CHANG, M., *et al.* PTI and ETI: convergent pathways with diverse elicitors. **Trends in Plant Science**, v.27(2), p.113-115, 2022.

CHEN, F., *et al.* An *Arabidopsis thaliana* gene for methyl salicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. **The Plant Journal**, v.36(5), p.577–588, 2003.

COFFEE, R. A. Electrodynamics crop spraying. **Outlook on Agriculture**, Elmsford, v.10 (7), p.350-356, 1981.

CONSTANTIN, E. C. *et al.* Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v.65, p.792–806, 2016.

DE SÁ, G. N. V.; TEBALDI, N. D. Inactivated bacterial suspension to control tomato bacterial spot. **Tropical Plant Pathology**, v.47, p.583-589, 2022.

DÍAZ-GALIANO, F. J. *et al.* Use of high-resolution mass spectrometry for the first-time identification of gerberin as a tentative marker of the fraudulent organic production of tomatoes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.112, ISSN 0889-1575, 2022.

DIE, J. V. *et al.* Design and Sampling Plan Optimization for RT-qPCR Experiments in Plants: A Case Study in Blueberry. **Frontiers Plant Science**, v.7. p.271, Mar 7, 2016.

EGEL, D. S., *et al.* Distribution and characterization of *Xanthomonas* strains causing bacterial spot of tomato in Indiana. **Plant Health Progress**, v.19, p.319-321, 2018.

ENEBE, M. C.; BABALOLA, O. O. The impact of microbes in the orchestration of plants' resistance to biotic stress: a disease management approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, p.9-25, 2019.

EVSEEVA, N. V., *et al.* Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v.34(1), p.3, 2018.

FAILLACE, G. R.; SANTARÉM, E. R.; ASTARITA, L. V. Extrato de *Xanthomonas axonopodis* induz resistência em *Solanum tuberosum* contra *Pectobacterium atrosepticum*. **Biologic control**, v.134, p.53-62, 2019.

FAO, 2022. **Statistical Dates**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. acesso em:30/10/2022.

FATHI, F., RISEH, R. S.; MORANDI, M. The Effects of Biocontrol *Bacillus* and *Pseudomonas* Strains on Plant Growth and Biochemical Defense Mechanisms in Pistachio Seedlings Inoculated with *Phytophthora Drechsleri*. **Pistachio and Health Journal**, v.1(3), p. 15-26, 2018.

FEDONENKO, Y. P. *et al.* Involvement of the lipopolysaccharides of *Azospirilla* in the interaction with wheat seedling roots. **Microbiology**, v.70, p.329–334, 2001.

FERRAZ, H. G. M. *et al.* Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 4, p.417-427, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed: Viçosa: **Editora UFV**, p.412, 2003.

FURTADO, L. M. *et al.* Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p.237-239, 2010.

GLAWE, D. A. The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.46, p.27-51, 2008.

GÖRLACH, J. *et al.* Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates genes expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, v. 8, p.629-43, 1996.

GUZMÁN-PLAZOLA, R. A.; DAVIS, R. M.; MAROIS, J. J. Effects of relative humidity and high temperature on spore germination and development of tomato powdery mildew (*Leveillula taurica*). **Crop Protection** v.22, p.1157-1168, 2003.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.387-412, 1996.

HAJAM, I. A. *et al.* Flagelina bacteriana - um agente imunomodulador potente. **Experimental & Molecular Medicine**, v.49, p.373, 2017.

HAMMERSCHMIDT, R. Systemic acquired resistance. In: Van Loon, L.C., ed. **Advances in botanical research. Academic Press**, p. 324, 2009.

HAMMERSCHMIDT, R. e KUC, J. Induced Resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology). **Kluwer Academic Pub**, v.4, p.182, 1995.
HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular Microbiology**, v.9, p.1-12, 2007.

HARVEY, M.; QUILLEY, S.; BEYNON, H. Exploring the tomato: transformations of nature, society, and economy. **Cheltenham, Edward Elgar**, p. 324, 2002.

HEIL, M.; BALDWIN, I. T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, v.7(2), p.61-67, 2002.

HEINEN, R. *et al.* Exogenous application of plant hormones in the field alters aboveground plant–insect responses and belowground nutrient availability, but does not lead to differences in plant–soil feedbacks. **Arthropod Plant Interactions**, v.14 (5), p.559–570, 2020.

HENRY, G.; THONART, P.; ONGENA M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnology, agronomy and Environment**, v.16(2), p.257-268, 2012.

HETHERINGTON, A. M.; BROWNLEE, C. The generation of Ca₂⁺ signals in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.263-88, 2004.

HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; VAN PELT, J. A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, v.86, p.757-62, 1996.

HORVATH, D. M., *et al.* Transgenic Resistance Confers Effective Field Level Control of Bacterial Spot Disease in Tomato. **Plos one**, v.7(8), p. 42036, 2012.

HUANG, C. H., *et al.* Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, v.96, p.221– 227, 2012.

HUOT, B., *et al.* Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. **Molecular Plant**, v.7, p.1267-1287, 2014.

IEA, 2019. Dados de produção paulista. **Secretaria de agricultura e abastecimento e o Instituto de economia agrícola (IEA) de São Paulo**. <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/index.php>. Acesso em: 30/10/2020.

IIZASA, S., *et al.* Transcriptome analysis reveals key roles of AtLBR-2 in LPS-induced defense responses in plants. **BMC Genomics**, v.18(1), p.995, 2017.

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

JACOB, D.; DAVID, D. R.; ELAD, Y. Biology and biological control of tomato powdery mildew (*Oidium neolycopersici*). **Biological control of fungal and bacterial plant pathogens IOBC/wprs Bulletin**, v.30, p.329-332, 2007.

JAKAB, G. *et al.* β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.07, p.29-37, 2001.

JAYANNA, S. K.; UMESHA, S. Enhancement of the expression of defense genes in tomato against *Ralstonia solanacearum* by N-octanoyl-L-homoserine lactone. **African Journal of Microbiology Research**, v.11, p. 194-203, 2017.

JONES, J. B. *et al.* Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, v.76, p.430–434, 1986.

JONES, J. B. *et al.* List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 925– 927, 2004.

JONES, J. T., *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v14, p.946-961, 2013.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The Plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

JONES, J. B.; PARET, M. L. Nano-magnesium oxide: a novel bactericide against copper tolerant *Xanthomonas perforans* causing tomato bacterial spot. **Phytopathology**, v.109, p.52-62, 2018.

JUKANTI, A. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. ©Springer Nature Singapore ISBN 978-981-10-5747-2 (eBook), 2017.

JUNIOR, A. M. **Pontas de pulverização e qualidade da aplicação com pulverização costais**. **Revista Cultivar**. 2018. <https://revistacultivar.com.br/artigos/pontas-de-pulverizacao-e-qualidade-da-aplicacao-com-pulverizadores-costais>. Acessado em 13 de abril de 2022.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** v.60, p.969–979, 1970. <https://doi.org/10.1094/phyto-60-969>

KIDWAI, M.; AHMAD, I. Z.; CHAKRABARTY, D. Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. **Plant Cell Reports**, v.39(11), p.1381–1393, 2020.

KRAEPIEL, Y.; BARNY, M. A. Bactérias fitopatogênicas Gram negativas, afinal todas hemibiotróficas?. **Molecular Plant Pathology**, v.17(3), p.313–316, 2016.

KLEIN-GORDON, J., et al. Assessing changes and associations in the *Xanthomonas perforans* population across Florida commercial tomato fields via a state wide survey. **Phytopathology**, 08 de abril de 2021.

KRAEPIEL, Y.; BARNY, M. A. Bactérias fitopatogênicas Gram negativas, afinal todas hemibiotróficas?. **Molecular Plant Pathology**, v.17(3), p.313–316, 2016.

KRÖNER, A. et al. Quantitative resistance of potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: Integrating PAMP-Triggered response and pathogen growth". **PLoS ONE**, v.6(8), p.2333, 2011.

KUTSCHERA, A.; RANF, S. The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. **Biochimie**, v.159, p.93-98, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.028>

LAGE, D. A. C. Epidemias de oídio e requeima do tomateiro orgânico em diferentes sistemas de irrigação: quantificação e progresso temporal. **Tese (Dourado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília**, Brasília, 105, 2012. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/14448>. Acessado em 05 de maio 2022.

LANNA-FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.12, p.1381-1387, 2010.

LAVANYA, S. N. et al. Immunity elicitors for induced resistance against the downy mildew pathogen in pearl millet. **Nature scientific reports**, v.12, p.4078, 2022.

LEE, S., et al. Nucleolar GTP-Binding Protein 1-2 (NOG1-2) Interacts with Jasmonate-ZIM Domain Protein 9 (JAZ9) to regulate Stomatal Aperture during Plant Immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.1992, 2018.

LI, Y. **Power Mildew of Tomato**. 04/2013. Disponível em: https://portal.ct.gov/media/CAES/DOCUMENTS/Publications/Fact_Sheets/Plant_Pat_hology_and_Ecolog/POWDERYMILDEWOFTOMATO040113pdf.pdf?la=en. Acesso:14/06/2022.

LIAO, Y. Y., et al. Nano-Magnesium Oxide: A Novel Bactericide Against Copper-Tolerant *Xanthomonas perforans* Causing Tomato Bacterial Spot. **Disease Control and Pest Management**, v.109, p.52-62, 2019.

LIYANAPATHIRANAGE, P.; JONES, J. B.; POTNIS, N. Mutation of a Single Core Gene, *tssM*, of Type VI Secretion System of *Xanthomonas perforans* Influences Virulence, Epiphytic Survival, and Transmission During Pathogenesis on Tomato. **Phytopathology®** v.112(4), p.752–764, 2022.

LI, N. et al. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/Jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering ?. **International Journal of Molecular Sciences MDPI**, v.20, p.671, 2019.

LIU, W.; SAINT D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.294, p.347-353, 2002.

LISZKAY, A.; VAN DER ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates (O_2 (center dot-), H_2O_2 , and (OH)-O-center dot) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology** 136: 3114-3123. 2004.

LIYANAPATHIRANAGE, P.; JONES, J. B.; POTNIS, N. Mutation of a Single Core Gene, *tssM*, of Type VI Secretion System of *Xanthomonas perforans* Influences Virulence, Epiphytic Survival, and Transmission During Pathogenesis on Tomato. **Phytopathology®** v.112(4), p.752–764, 2022.

LOUWS, F. J., et al. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v.85, p.481, 2001.

LUNA-DIEZ, E. Using green vaccination to brighten the agronomic future. **Outlooks on Pest Management**, v.27(3), p.136–140, 2016.

MALIK, N. A. A.; KUMAR, I. S.; NADARAJAH, K. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.963. <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>

MATUO, T. **Técnicas de aplicação de defensivos agrícolas**. Jaboticabal: FUNEP, p.139, 1990.

MAPA, BRASIL. 1995. **Portaria Nº 553**, 30 de agosto. Norma de identidade, qualidade, acondicionamento, embalagem e apresentação do tomate. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/portaria+553_95_000gl3vxjrx02w x5ok0xkgyq582yfj4l.pdf. Acesso: 27 de julho de 2022.

MARTÍNEZ, F.; OLIVEIRA, J. A.; CALVETE, E. O.; PALENCIA, P. Influence of growth medium on yield, quality indexes, and SPAD values in strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v.217, p.17-27, 2017.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? Are- view. **Phytochemistry**, v.67(21), p.2318–2331, 2006.

MELLO, S. C.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Diagrammatic scale for evaluation of tomato bacterial spot. **Fitopatologia Brasileira** v.22(3), p.447-448, 1997.

MEZIANE, H., *et al.* Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 are involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v.6(2), p.177-185, 2005.

MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. **Plant Journal**, v.50, p.500–513, 2007.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v.162, p.491-498, 2002.

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

MORAES, W. B. *et al.* Aplicação foliar de fungicidas e produtos Alternativos reduz a severidade dooídio do tomateiro. **Nucleus**, v.8, outubro, 2011.

MCGUIRE, R. G. *et al.* Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and bacterial spot of tomato as influenced by nitrogen and potassium fertilization. **Phytopathology**, v.81, p.656– 660, 1991.

MISHRA, B. B.; GAUTAM, S. Polyphenol Oxidases: Biochemical and Molecular Characterization, Distribution, Role, and Its Control. **Enzyme Engineering**, v5, p.141, 2016. <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000141>

MÜLLER, O. A.; JAN GRAU, J.; THIEME, S.; PROCHASKA, H.; ADLUNG, N.; SORGATZ, A.; BONAS U. (2015) “Genome-wide identification and validation of reference genes in infected tomato leaves for quantitative RT-PCR analyses”. **PLoS ONE**, v.10(8), p.1–22, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136499>

NADARAJAH, K.; KASIM, N. M.; FUI, V. V. Function of Mitogen-Activated Protein Kinase Gene in Biotic Stress. *Asian Journal Plant Science*, v.8, p.191–198, 2009. <https://doi.org/10.3923/ajps.2009.191.198>

NAFIE, E. e MAZEN, M. Chemical-induced resistance against browns tem rot in soybean: The effect of benzothiadiazole. **Journal of Applied Sciences Re- search**, v.4, p.2046–2064, 2008.

NEWMAN, M. A., *et al.* Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant Pathology**, v.1(1), p. 25-31, 2000.

NGADZE, E. *et al.* Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. **Plant Disease**, v.96, p.86-192, 2012.

NOVAES, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.10-13, 2004.

NÜRBERGER, T. *et al.* High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Plant Cell**, v.78, p.449-60, 1994.

O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v.129, p.113–139, 2000.

OKEY, E. N.; SREENIVASAN, T. N. Salicylic acid: a factor in systemic resistance of cacao to *Phytophthora palmivora*. In: Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. **British Crop Protection Council**, v.3, p.955-60, 1996.

OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. In **Plant Cell**, v.13(1), p.179–191, 2001.

OSDAGHI, E. *et al.* A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. **Molecular Plant Pathology**, v.22(12), p.1500–1519, 2021.

PALTI, J. The *Leveillula mildews*. **The Botanical Review**, v.132, p.423- 535, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02858418>

PARK, S. W., *et al.* Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. **Science** v.318, p.113-116, 2007.

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

PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Uso de indutores de resistência: conceito, realidade e perspectivas. In: **FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Milho: manejo e produtividade**. Piracicaba: USP/ESALQ/IPV, p.177- 181, 2009.

PASCHOLATI, S. F.; MELO, T. A.; RONALDO, J. D. **Visão agrícola**, Piracicaba, n13, p. 110-112, 2015. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA_13_Protecbox1.pdf. Acesso em: 22 out. 2022.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v.9, p.534- 540, 2004.

PREININGER, C., *et al.* “Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants”. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102(17), p.7265-7282, 2018.

PROKOP, M.; VEVERKA, K. Influence of droplet spectra on the efficiency of contact fungicides and mixtures of contact and systemic fungicides. **Plant Protection Science**, Prague, v.42(1), p.26-33, 2006.

POHRONEZNY, K. *et al.* Sudden shift in the prevalent race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper fields in South Florida. **Plant Disease**, v.76, p.118–120, 1992.

POTNIS, N., *et al.* Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular Plant Pathology**, v.16, p. 907–920. 2015.

QIAO, K., *et al.* Management of bacterial spot of tomato caused by copper-resistant *Xanthomonas perforans* using a small molecule compound carvacrol. **Crop Protection**, v.132, p.105-114, 2020.

QIN, Y. *et al.* A phenylalanine ammonia-lyase from *Fritillaria unibracteata* promotes drought tolerance by regulating lignin biosynthesis and SA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.213, p.574– 588, 2022.

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

RAIJ, B. V. *et al.* Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo. **Instituto Agrônomo/Fundação IAC**, 2 ed. p.184–185, 1997. ISSN: 0100-3100

RAAIJMAKERS, J. M., *et al.* Dose response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, V.85, P.1075-81, 1995.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M. Natural plant protection by 2,4 diacetyl phloroglucinol producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.11, p.144-52, 1998.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28(2), p.123-130, 2003.

RESENDE, M. L. V. *et al.* Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v32, p.213-221, 2007a.

RESENDE, M. L. *et al.* Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **RAPP**, Lavras-MG. v.15, 2013.

RIVAS-SAN, V. M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defense: Its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.3321-3338, 2011. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>

RIETSCHEL, E. T. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **The FASEB Journal**, v. 8(2), p. 217– 225, 1994.

SCHONINGER, E. L.; GATIBONI, L. C.; LINHARES, D. Mehlich 3 method as substituent to the HCl method for extraction of Copper and Zinc in soils from Southern Brazil with high levels of organic matter. **Ciência Rural**, v.42(7), p.1200-1203, 2012.

SIAH, A., *et al.* Natural Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Diseases. **Natural Antimicrobial Agents**, p.121–159, 2018.

SILIPO, A. *et al.* The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. **Journal Biology Chemistry**, v.280, p.33660– 33668, 2005.

SIMÕES, C. T.; CARVALHO, V. N.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Prospecting of pathogen-derived elicitors for the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Protection Research** v.61(2), p.183–188, 2021.

STALL, R. E.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. **Annual Review Phytopathology** 47:265–284, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurevphyto-080508-081752>

STEFFENS, T. *et al.* The lipopolysaccharide of the crop pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*: Chemical characterization and determination of signaling events in plant cells. **Glycobiology** 27 (3):264–274, 2017.

STEINER, U.; SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt, R. e Kuc` J. (eds.). Induced Resistance to Disease in Plants – Developments in Plant Pathology. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, v.4, P.86-110, 1995.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry Academic Press**, p.387-416, 1997.

STRINGLIS, I. A.; PIETERSE, C. M. J. Evolutionary “hide and seek” between bacterial flagellin and the plant immune system. **CELL Host & Microbe**, v. 29, p.448-450, 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p.819, 2009.

THAYER, P. L.; STALL, R. E. The survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.75, p.163–165, 1962.

TAKAKURA, Y. *et al.* Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants. **Molecular Plant Pathology**, v.9(4), p.525–529, 2008.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, v. 138(4), p.414–429, 2010.

TUZUN, S., KLOPPER, J. Practical application and implementation of induced resistance. In: KUC, J. (Ed.). Induced resistance to diseases in plants. Dordrecht, The Netherlands: **Kluwer Academic Press**, p.152-68, 1995.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia-lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, p. 68-71, 2006.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A.; PIETERSE, C. M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-83, 1998.
VALLAD, G. E., et al. Comparison of kasugamycin to traditional bactericides for the management of bacterial spot on tomato. **Hortscience**, v.45, p.1834-1840, 2010.

VAUTERIN, L. *et al.* Reclassification of *Xanthomonas* sp. v.45, p.472–489, 1995.
VOS, I. A.; PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M. Costs and benefits of hormone-regulated plant defenses. **Plant Pathology**, v.62(1), p.43–55, 2013.

WALTERS, D.; FOUNTAINE, J. Practical application of induced resistance to plant diseases: An appraisal of effectiveness under field conditions. **Journal Agriculture Science**, v.147, p.523, 2009.

YARIPOUR, Z. *et al.* Host range and phylogenetic analysis of *Xanthomonas alfalfae* causing bacterial leaf spot of alfalfa in Iran. **European Journal of Plant Pathology**, v.150, p. 267–274, 2018.

YOSHIDA, K. *et al.* Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Apply Microbiology Biotechnology**, v.60, p.665–670, 2003.

ZHANG, J.; SUN, X. Recent advances in polyphenol oxidase-mediated plant stress responses. **Phytochemistry**, v.181, p.112588, 2021.

ZHOU, T.; PAULITZ, T. C. Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. On cucumber. **Journal of Phytopathology**, v.142, p.51-63, 1994.

ZIPFEL, C. *et al.* Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. **Nature**, v.428, p.764, 2004.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.414–420, 2009.

APÊNDICE A – Arquivo suplementar 1

Parâmetros de síntese dos primers nesses estudos

Oligo	Start	Length	Tm	GC%	Any	3	Sequência Amplicon	Oligo
PAL F	1771	18	58.29	55.56	3	2	CTCTGGCAATGGGTGCTA	100
PAL R	1902	20	59.55	55	2	0	GCATCAAAGGGTAGGTGGAG	
PO F	436	20	60.01	50	4	4	CGTTGGTTGCTAGAGATGCA	200
PO R	635	20	60.07	50	4	1	GGCACCTGATAGAAGGACCA	
PPO F	1423	20	60.02	50	4	1	CAGCTTCGTCAAGGACAACA	157
PPO R	1579	20	59.85	50	4	4	GCAAACCTCCGCCTTATCAAGAG	
PHD F	-	22	60.2	59.1	-	-	GGGATGGGATGGAGCGTAGAGA	279
PHD R	-	22	58.9	54.5	-	-	CATCACTCTCCTCTTGCAGCCT	

Tabela complementar 1 – Informações gerais sobre os primers sintetizados utilizados na expressão diferencial de genes de defesa vegetal em tomateiro após aplicação de extrato bruto de lipopolissacarídeos flagelos. *Oligo =oligonucleotídeos utilizados para a síntese do primer, PO F e R = oligonucleotídeos forward e Reverse para o gene da peroxidase, PPO F e R = oligonucleotídeos forward e Reverse para o gene da polifenoloxidase, PAL F e R = oligonucleotídeos forward e Reverse para o gene fenilalanina amônia-liase e PHD F e R = gene endógeno. Comprimento = tamanho da sequência do primer, Tm = temperatura de Melting.

APÊNDICE B – Arquivo suplementar 2

Procedimento padrão para obtenção de RNA extraído de folhas em plantas de tomateiro previamente aplicadas com os elicitores e infectadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

Etapa	Procedimento
1	Procure a sequência genômica do gene em questão associado ao organismo estudado em um banco de dados disponível na internet (use preferencialmente o NCBI). Para ensaios de expressão gênica, é preciso escolher preferencialmente as bibliotecas de cDNA (região codificante)
2	Selecione a sequência de bases apresentada da biblioteca de cDNA, copie e cole num arquivo separado, salvando-a. Este arquivo é a base para a próxima etapa que constitui na utilização do software Primer3
3	Com a sequência de cDNA em mãos, jogue-a no software Primer3 logo na primeira página que mostra um campo para inseri-la. Marque as caixas de verificação Left Primer e Right primer, pois são as caixas referentes aos possíveis primers a serem confeccionados
4	Em seguida e rolando a página para baixo, aparece alguns campos para edição, que são os parâmetros básicos e importantes para a construção dos primers. Alguns campos são opcionais para preenchimento, e a própria interface do programa possui explicações ao lado desses campos, a exemplo dos Targets, correspondente às regiões da sequência que se pretende amplificar (pode deixar em branco, significando que em todas as regiões da sequência se pode anelar um primer, ou pode demarcar uma região específica para anelamento, simplesmente colocando colchetes para marcar a região)
5	Como os primers são desenhados com foco em ensaios de expressão gênica via qPCR, é preciso tomar alguns cuidados na escolha de alguns parâmetros essenciais e que se seguem após os opcionais, a saber: o tamanho do produto a ser amplificado (Product Size Ranges), que deve ser no máximo 150 pb, pois produtos pequenos são amplificados com maior eficiência; o tamanho dos primers (Primer Size), preferencialmente entre 18 a 22 pb; a temperatura de anelamento (Primer Tm), preferencialmente entre 55 a 60°C, para que haja um produto de amplificação único e específico; o conteúdo de GC (Primer GC%), que reflete a concentração de bases G e C nos primers e se recomenda escolher de 40 a 50%, pois concentrações mais altas podem favorecer o surgimento de estruturas secundárias indesejadas (dímeros de pirimidina, por exemplo)
6	Outros parâmetros se devem desconsiderar ou deixar como o programa já oferece, pois não são utilizados com rigor em ensaios de expressão gênica via qPCR e em sua grande maioria se referem às chances de se formar estruturas indesejadas, à estabilidade térmica dos primers e sua energia cinética, ao conteúdo total de íons metálicos na solução, entre outros campos
7	Após a edição e preenchimento correto desses parâmetros, clique no botão Pick Primer, em que aparecerá a janela de resultados com o par de iniciadores que o programa julgou mais adequado para se realizar a reação de qPCR, mostrando a sequência de cada primer (Sense/Left e Antisense/Right), o tamanho em pb, Tm e conteúdo de GC de cada um, entre outros valores não importantes.
8	No meio da página de resultados, o programa mostra a sequência de cDNA, a região em que cada primer se anela delimitada por uma série de sinais ">", que representa o primer Sense, e "<", o Antisense, e, portanto, a região amplificada de interesse, que é a sequência delimitada por estes sinais. Ao final da janela de resultados, o programa ainda oferece outros primers alternativos, que podem até ser usados, mas com cautela. É recomendável se ter primers que começam e terminem com C ou G, e que a diferença de Tm seja de no máximo 5°C
9	Salve esta janela de resultados como um arquivo PDF
10	Por fim, jogue o produto de amplificação obtido pelo Primer3 no programa BLAST, que é um software poderoso para se fazer alinhamento de sequências, confrontando então a sequência de interesse com o genoma de determinado

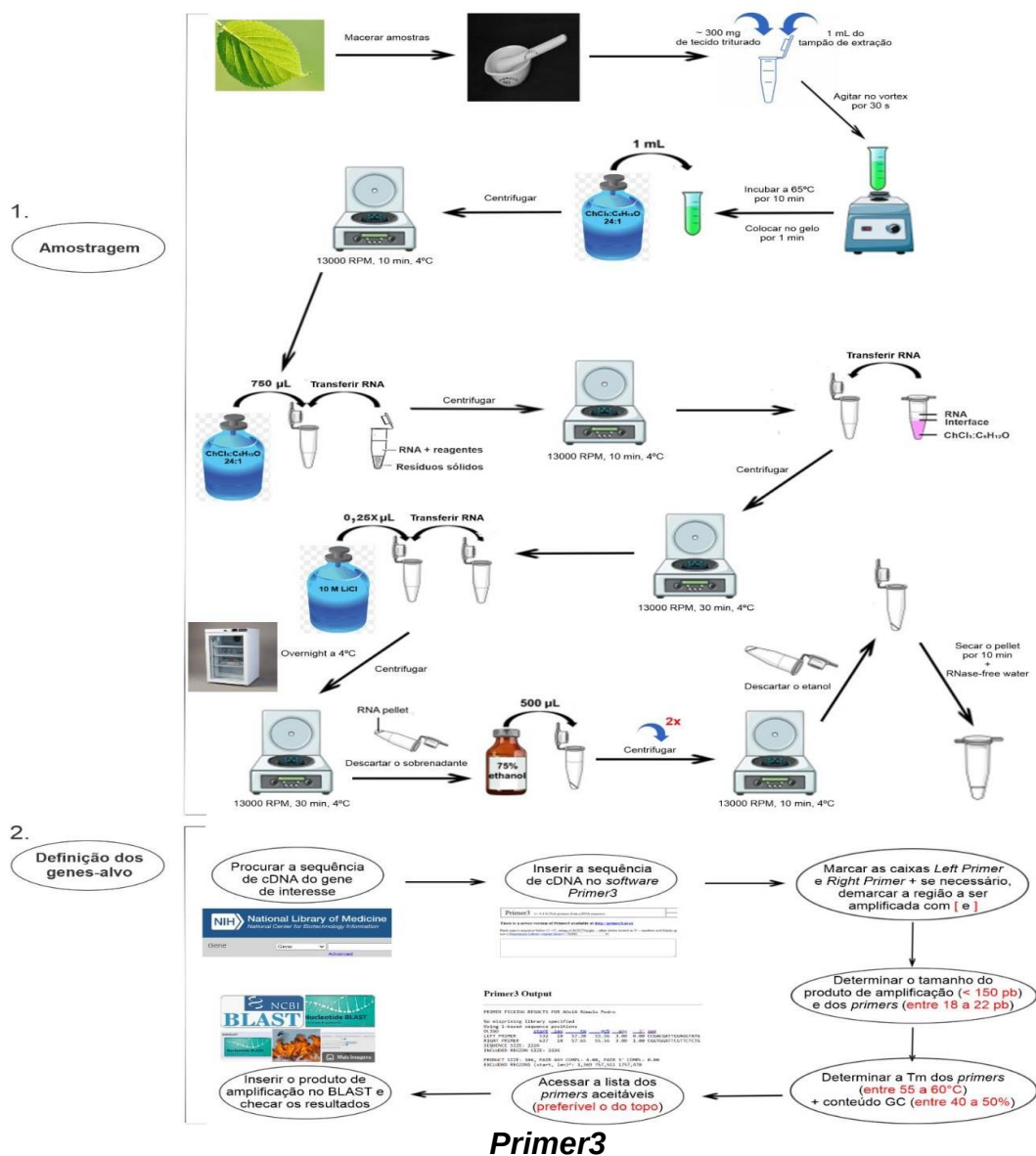
organismo em questão. Logo no início se tem o campo de preenchimento para inserir a amplificação de interesse, e depois se tem a opção de colocar em qual organismo é feito a busca. Clique no botão BLAST. O programa rapidamente mostrará a página dos resultados, contendo então os alinhamentos feitos de acordo com o grau de similaridade (em cores diferentes) com todas as sequências encontradas no banco de dados, além de uma lista de sequências similares ao trecho de cDNA inserido, em que se o gene de interesse já estiver no topo, isso significa que os primers desenhados pelo Primer3 são eficientes em amplificar o fragmento certo de cDNA.

11

Salve estes resultados obtidos no BLAST também como um arquivo PDF.

APÊNDICE C – Arquivo suplementar 3

Esquema que demonstra como conduzir um bom estudo para ensaios de expressão gênica com o protocolo de extração de RNA utilizado neste documento e o passo a passo para o desenho de primers com o *software*



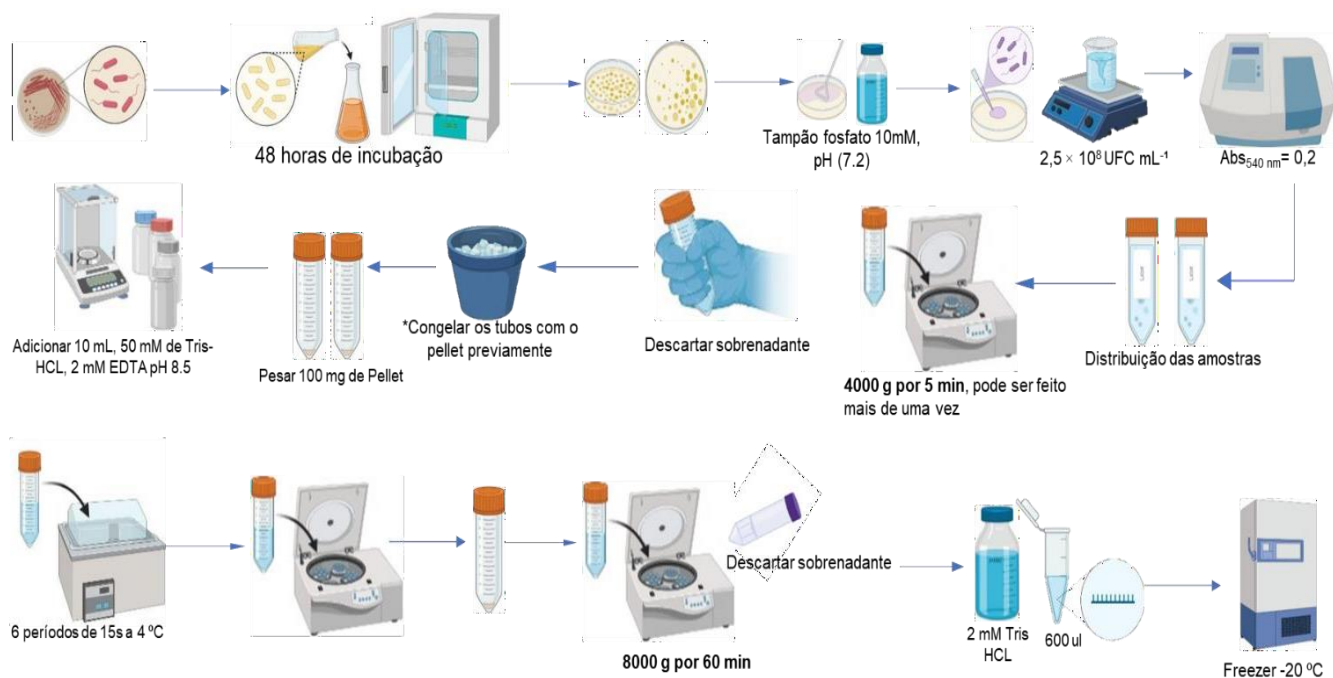
APÊNDICE D – Arquivo suplementar 4

Mini-protocolo de obtenção de extratos brutos de lipopolissacarídeos com o passo a passo de extração

- 1 Cultivar o isolado após obtenção de cultura pura com 48 horas de incubação, em placas de Petri 115 x 40 mm em meio 523 de Kado & Heskett para produção de biomassa bacteriana.
- 2 Realizar a remoção do crescimento bacteriano, suspendendo-o em tampão fosfato 10 mM, pH (7,2) e ajustar a concentração para 2.5×10^8 ufc mL⁻¹ (Abs_{540 nm} = 0,2).
- 3 Centrifugar os tubos falcon com a suspensão quantas vezes for necessário em rotação de 4.000 g por 5 min. **Descartar o sobrenadante** e iniciar o processo de liofilização com pellet formado. Obs: Caso o liofilizador não tenha refrigeração das amostras será necessário congelar as amostras previamente antes de ir para o equipamento.
- 4 Em seguida, 100 mg do pellet liofilizado **serão ressuspensos** em 10 ml da solução tampão de 50mM Tris HCL e 2 mM EDTA (pH 8,5).
- 5 Levar a solução ao **banho de ultrassom** por 6 períodos de 15 s a 4 °C.
- 6 Centrifugar a solução em rotação de 600 g por 20 min para remover células intactas. **Recolher o sobrenadante**.
- 7 Centrifugar o **sobrenadante** 8.000 g por 60 min e descartá-lo logo após para obter o extrato bruto de LPS como “pellet”. E ressuspender novamente em 600 µl de solução tampão 2 mM Tris HCL.
- 8 Manter as amostras do extrato bruto de LPS armazenado a **-20 °C** até o momento de uso.

APÊNDICE E – Arquivo suplementar 5

Mini-protocolo ilustrado de obtenção de extratos brutos de LPS



*Caso o liofilizador já tenha refrigeração de amostras ignorar etapa de congelamento.

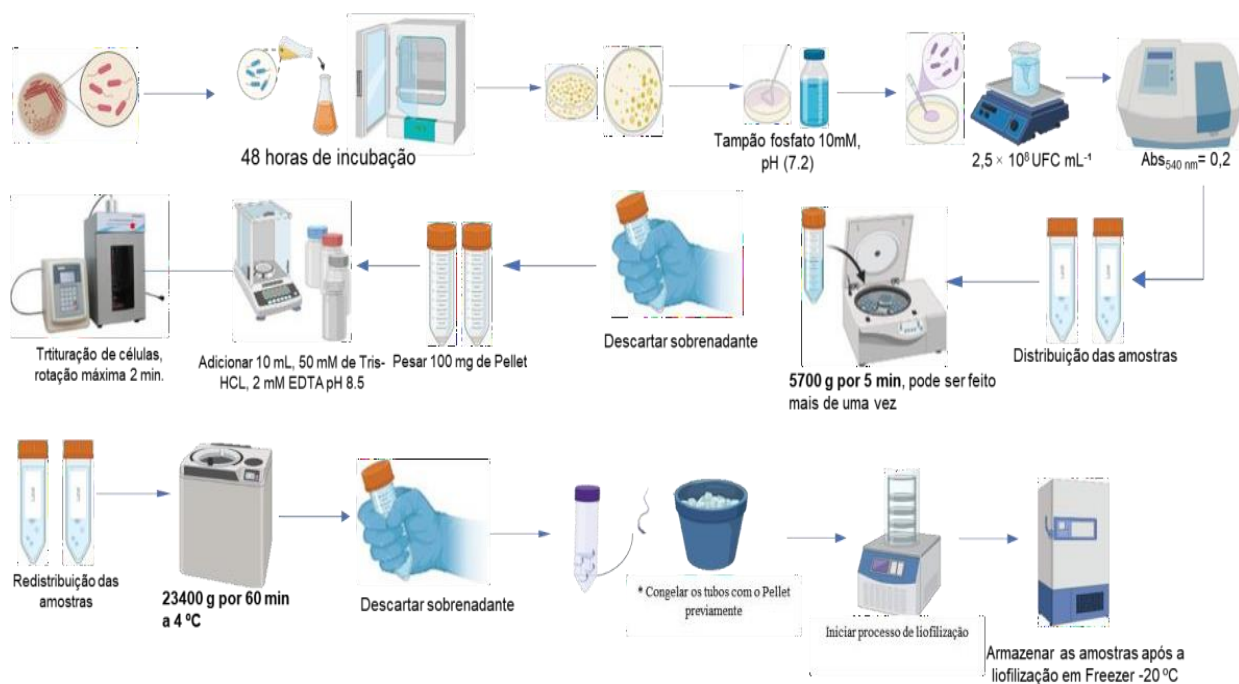
APÊNDICE F – Arquivo suplementar 6

Mini-protocolo de obtenção de extratos brutos de flagelos com o passo a passo de extração

- 1 Cultivar o isolado após obtenção de cultura pura com 48 horas de incubação, em placas de Petri 115 x 40 mm em meio 523 de Kado e Heskett para produção de biomassa bacteriana.
- 2 Realizar a **remoção** do crescimento bacteriano, suspendendo-o em tampão fosfato 20 mM, pH (7,4).
- 3 Ajustar a concentração para $2,5 \times 10^{-8}$ ufc mL⁻¹ (Abs540 nm= 0,2).
- 4 Centrifugar os tubos falcon com a suspensão em rotação de 5700 g por 5min. **Descartar o sobrenadante** após isso.
- 5 **Ressuspender** o pellet formado no tampão fosfato 20 mM, pH (7,4).
- 6 Em seguida, iniciar o **processo de trituração** e quebra física das células. Realize a quebra com um triturador de tecidos em rotação máxima por 2 minutos.
- 7 Realizar a remoção dos fragmentos celulares por centrifugação 23400 g por 60 min a 4 °C. **Descartar o sobrenadante** após isso.
- 8 Iniciar o processo de **liofilização** com pellet formado. Obs: Caso o liofilizador não tenha refrigeração das amostras será necessário congelar as amostras previamente antes de ir para o equipamento.
- 9 Armazenar em freezer -20 °C para longas período de estocagem.

APÊNDICE G – Arquivo suplementar 7

Mini-protocolo ilustrado de obtenção de extratos brutos de Flagelos



*Caso o liofilizador já tenha refrigeração de amostras ignorar etapa de congelamento.