



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO PEPTÍDEO
EPSILON-POLI-L-LISINA CONTRA FITOPATÓGENOS**

Bárbara Rodrigues

UBERLÂNDIA - MG

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO PEPTÍDEO
EPSILON-POLI-L-LISINA CONTRA FITOPATÓGENOS**

Aluna: Bárbara Rodrigues

Orientador: Dr. Rafael Nascimento

Co-Orientadora: Dra. Tâmara Prado de Moraes

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA - MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696c Rodrigues, Bárbara, 1992
2017 Caracterização da atividade antibacteriana do peptídeo Epsilon-poli-
l-lisina contra fitopatógenos [recurso eletrônico] / Bárbara Rodrigues. -
2017.

Orientador: Rafael Nascimento.

Coorientadora: Tâmara Prado de Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1349>

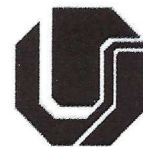
Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Peptídeos. 3. Fitopatologia. 4. Lisina. I. Nascimento,
Rafael, 1983, (Orient.). II. Moraes, Tâmara Prado de, 1986, (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



Ata da Apresentação Pública de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Apresentação Pública: Dissertação de Mestrado

Local: Uberlândia/MG

Data: 31/07/2017 Hora de início: 08:30h

Hora de encerramento: 09:00h

Discente: Bárbara Rodrigues

Matrícula: 11522GBI002

Título do Trabalho: Caracterização da atividade antibacteriana do peptídeo Epsilon-Poli-L-lisina contra fitopatógenos.

Área de concentração: Genética

Linha de pesquisa: Biotecnologia Vegetal

Projeto de Pesquisa de vinculação: Caracterização da atividade antibacteriana do peptídeo Epsilon-Poli-L-lisina contra fitopatógenos.

Aos 31 dias do mês de julho de dois mil e dezessete, às 08:30 horas no Auditório 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, realizou-se a Apresentação Pública da Dissertação de Mestrado do (a) Discente. A Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica foi assim composta: Prof. Dr. Rafael Nascimento (Orientador), Prof. Dr. Paulo Adriano Zaini e Prof.ª Dr.ª. Hebréia Oliveira Almeida Souza, realizou o processo de avaliação não presencial e considerou o (a) candidato (a) APROVADO (A).

Caso haja mudança no Título da Dissertação, informe o novo título ou demais sugestões:

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pelo Coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

CONFERE COM O ORIGINAL
Secretaria da Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Universidade Federal de Uberlândia

Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Universidade Federal de Uberlândia
Bl. 2E sala 204 - Campus Umuarama
38400-902 - Uberlândia - MG

Renata Santos Rodrigues

Prof.ª Dr.ª. Renata Santos Rodrigues

Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Genética e Bioquímica

Universidade Federal de Uberlândia

Prof.ª Dr.ª. Renata Santos Rodrigues

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica - Portaria R nº 867/2015

Dedicatória

À Deus, que me permitiu chegar onde cheguei.

À comunidade científica.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

A todos que estiveram envolvidos e de alguma forma me auxiliaram na conclusão do meu mestrado.

Primeiramente, minha família, por me apoiarem e permitirem minha formação a título de Mestre.

Ao Gustavo, por todo companheirismo durante esses 2 anos.

À Universidade Federal de Uberlândia, e todo corpo docente.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos usuários do laboratório de Nanobiotecnologia, principalmente ao Prof. Dr. Luiz Ricardo, por toda ajuda e infraestrutura oferecida em seu laboratório.

Ao meu orientador Rafael Nascimento e minha co-orientadora Tâmara, pessoas em quem me inspiro, obrigada por confiarem em mim e pelos conhecimentos que levarei para sempre comigo.

À Profa. Dra. Nilvanira e a Lara, por todo trabalho prestado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, paciência e disposição.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia pelas análises de MEV, e ao técnico Rafael.

A todos do nosso grupo Plant Team, em especial Paulo Zaini, Lorraine, Jéssica e Hebréia, foi muito agradável trabalhar com vocês.

Minhas companheiras Cristiane, Isabela e Sara, obrigada por todos os momentos divertidos que passamos juntas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Belleti e a Rosiane pelo auxílio com a fixação de células.

À Embrapa, por ceder os isolados de bactérias.

Cada um de vocês contribuiu para a conclusão deste trabalho, e minha formação tanto pessoal quanto profissional.

“We keep moving forward, opening new doors, and doing new things, because
we’re curious and curiosity keeps leading us down new paths”

Walter Elias “Walt” Disney

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Bactérias fitopatogênicas	10
1.2 <i>Ralstonia solanacearum</i>	12
1.3 <i>Xanthomonas spp.</i>	14
1.3.1 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	15
1.3.2 <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	17
1.4 <i>Agrobacterium spp.</i>	19
1.4.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
1.5 Peptídeos Antimicrobianos	22
1.5.1 Peptídeos antimicrobianos no controle de fitopatologias	26
1.5.2 Epsilon-Poli-L-lisina	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos Gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Micro-organismos	31
3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	32
3.3 Curvas de Mortalidade	32
3.4 Espectroscopia de Fluorescência	33
3.5 Microscopia de Fluorescência	33
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	34
3.7 Teste de Patogenicidade	35
3.8 Teste <i>in vivo</i>	35
3.9 Análises Estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Ensaio de <i>Spotting</i>	36
4.2 Curvas de mortalidade	39
4.3 Espectroscopia de Fluorescência	44
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	47
4.5 Teste <i>in vivo</i>	50
5. CONCLUSÃO	53
Referências	53

Resumo

RODRIGUES, Bárbara. Caracterização da atividade antibacteriana do peptídeo Epsilon-poli-L-lisina contra fitopatógenos. 2017. Mestrado em Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

As fitobactérias constituem um importante grupo de patógenos de plantas, não somente pela alta incidência em culturas de valor econômico, mas também pela facilidade que se disseminam e pelas dificuldades encontradas para controlar as enfermidades causadas, sendo urgente a necessidade de desenvolver novos agentes de controle. Os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) participam da defesa inata de inúmeros organismos e são considerados potenciais agentes terapêuticos no combate a diversos patógenos, em virtude de suas propriedades antivirais, antifúngicas e antibacterianas. Um exemplo de AMPs é a ϵ -Poli-L-lisina (ϵ -PL), um homopolipeptídeo formado por resíduos de lisina, que demonstrou atividade antimicrobiana contra diversos micro-organismos, e apresenta diversas vantagens, tais como a solubilidade em água, biodegradabilidade, e não-toxicidade, podendo ser um candidato para o controle de fitopatógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo ϵ -PL contra as fitobactérias *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* e *Agrobacterium tumefaciens*. Foram conduzidos ensaios de *spotting* para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo, e a partir dos valores de CIM, ensaios de curva de mortalidade avaliaram a eficiência do peptídeo em função do tempo através da contagem de células viáveis ou inviáveis. Espectroscopia de fluorescência e microscopia de fluorescência quantificaram e demonstraram visualmente a fluorescência emitida pelas bactérias viáveis e inviáveis. Para avaliar a caracterização estrutural das células após tratamento com o peptídeo foi realizada microscopia eletrônica de varredura. As CIMs foram de 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para *X. citri*, 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para *A. tumefaciens*, e 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para *R. solanacearum* e *X. euvesicatoria*, e a atividade bactericida da ϵ -PL foi confirmada através dos ensaios de curva de mortalidade. Plantas de tomate inoculadas com *X. euvesicatoria* foram pulverizadas com solução de ϵ -PL, e a redução na severidade da doença foi confirmada. A ϵ -PL representa uma alternativa promissora para o controle *in vivo* de doenças bacterianas.

Palavras-chave: fitobactérias, peptídeos antimicrobianos, ϵ -Poli-L-lisina.

Abstract

Phytophacteria constitute an important group of plant pathogens, not only because of their high incidence in crops of economic value, but also because they are easily disseminated and are the cause of diseases that are difficult to control. Therefore, there is an urgent need to develop new control agents. Antimicrobial peptides (AMPs) are part of host defense in several organisms, and are considered potential therapeutic agents able to combat various pathogens due to their anti-viral, antifungal and antibacterial properties. An example of AMPs is the ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL), a homopolypeptide formed by lysine residues, which demonstrated antimicrobial activity against several microorganisms, and presents some advantages such as water solubility, biodegradability, and non-toxicity, being a candidate for the control of phytopathogens. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the ϵ -PL peptide against the phytophacteria *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* and *Agrobacterium tumefaciens*. Spotting assays were conducted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the peptide and from the MIC values, mortality curve assays evaluated the bactericidal efficiency of the peptide over time by counting viable cells. Fluorescence spectroscopy and fluorescence microscopy quantified and visually demonstrated the fluorescence emitted by viable or non-viable bacteria. In order to see structural changes caused in the treated cells, scanning electron microscopy was performed. MICs were 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *X.citri*, 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *A. tumefaciens*, and 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *R. solanacearum* and *X. euvesicatoria*, and the bactericidal effect of ϵ -PL was confirmed by mortality curve assays. Tomato plants inoculated with *X.euvesicatoria* were sprayed with ϵ -PL solution, and the reduction in disease severity was confirmed. ϵ -PL represents a promising alternative for the *in vivo* control of bacterial diseases.

Key words: phytophacteria; antimicrobial peptides; ϵ -Poly-L-lysine.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias fitopatogênicas

Bactérias fitopatogênicas (ou fitobactérias) são os agentes infecciosos responsáveis pelas principais doenças em diversos tipos de plantas, e são consideradas fator de preocupação no século XXI devido às consideráveis perdas de produtividade e ao impacto causado na produção agrícola em todo o mundo (VIDHYASEKARAN, 2002).

O conhecimento acerca desses patógenos é importante devido à alta incidência e à gravidade das doenças em culturas exploradas economicamente, a facilidade e a rapidez com que se disseminam, e as dificuldades encontradas para o controle e erradicação das enfermidades causadas por estes (ROMEIRO, 2005).

As fitobacterioses são mais frequentes em regiões de clima tropical, uma vez que as condições de alta temperatura e umidade favorecem o desenvolvimento destas doenças, e a ocorrência frequente de chuvas é essencial para que haja a disseminação das fitobactérias (ROMEIRO, 2005; GAMA et al., 2016).

Os principais sintomas causados por fitobactérias são associados a fatores de virulência e patogenicidade produzidos pelo patógeno durante a interação com o hospedeiro e incluem: anasarca ou encharcamento, mancha foliar, podridão mole, murcha vascular, hipertrofia, cancro, morte das pontas, talo oco e canela preta (GAMA et al, 2016).

Para os produtores, o grande desafio tem sido encontrar o manejo eficiente de fitobacterioses, sobretudo em condições de clima tropical. Tais práticas consistem em um conjunto de medidas de controle que começam a ser executadas antes mesmo da implementação da cultura, passando por todo o ciclo de cultivo e se estendendo até a pós-colheita. Estas medidas podem atuar sobre: o patógeno; reduzindo a quantidade de inóculo inicial ou a taxa de progresso da doença; o hospedeiro ou o ambiente, e podem ser aplicadas a nível nacional, a exemplo das leis quarentenárias, ou em nível regional ou local, alterando ou evitando condições favoráveis à sua ocorrência (LOPES; DUVAL, 2007).

As leis quarentenárias regulamentam a entrada e o transporte de materiais de origem vegetal que potencialmente contenham patógenos quarentenários, ou seja, fitobactérias que não ocorrem em todo território nacional, e não estejam disseminadas em todos os estados, sendo uma medida que visa reduzir os danos causados pelas fitobacterioses (GAMA et al., 2016).

O controle das doenças auxilia na prevenção de infestações em campos ou infecções de culturas com patógenos bacterianos. O uso de sementes e material de propagação saudáveis, práticas sanitárias que visam eliminar a fonte de inóculo dentro da área pela remoção de partes das plantas doentes e eliminação de plantas vivas infectadas são importantes medidas de controle. Muitas bactérias penetram via ferimentos, portanto deve-se tomar cuidado ao realizar os tratos culturais, sendo uma importante medida para redução de fitobacterioses. A limpeza e desinfestação de instrumentos de trabalho também evitam a dispersão de bactérias entre as plantas (GAMA et al., 2016).

A rotação de culturas é eficiente com bactérias que possuem limitados hospedeiros e que sobrevivem em restos de culturas, sendo inefetiva contra bactérias que atacam diversos tipos de culturas, e de difícil implementação em culturas perenes. Variedades resistentes de plantas seria uma das melhores formas de evitar grandes perdas, por não causarem impacto ambiental e serem de fácil aplicação, e em conjunto com práticas culturais apropriadas e a aplicação de produtos químicos, se tornam os meios mais efetivos para o controle de doenças bacterianas (MICHEREFF, 2014).

O controle biológico de doenças bacterianas consiste em utilizar organismos vivos para reduzir o inóculo do patógeno e têm apresentado sucessos práticos, através do tratamento de sementes e material de propagação com antagonistas produtores de bacteriocinas, por exemplo (GAMA et al., 2016).

O controle químico de doenças bacterianas baseia-se na aplicação de fungicidas com efeito bactericida e/ou bacteriostático, indutores de resistência, antibióticos e inseticidas (ROMEIRO, 2005). Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos produtos para o controle de fitobacterioses foliares que causam perdas em culturas economicamente importantes. Os compostos cúpricos, usados em pulverizações foliares, apresentam efeito bactericida ou bacteriostático, e são amplamente utilizados para o controle preventivo de fitobacterioses.

Antibióticos também são utilizados contra certas doenças bacterianas, porém devem ser utilizados com cautela devido à possibilidade de surgimento de populações resistentes do patógeno (MICHEREFF, 2014).

Para um manejo eficaz, é necessário o conhecimento prévio acerca do patógeno, de suas características específicas, e de como ocorre sua sobrevivência e sua disseminação entre as culturas, visando reduzir a ocorrência das doenças (ROMEIRO, 2005; KADO, 2010).

1.2 *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum (SMITH, 1896) é o agente causal da murcha bacteriana (exceto quando acontece na bananeira, na qual é chamada Moko), uma das doenças mais destrutivas para muitas culturas importantes, e a principal doença vascular de etiologia bacteriana encontrada no mundo. Foi observada inicialmente em plantas de tabaco no Japão ao final do século 17 (KELMAN, 1953; MORAIS, 2015; GAMA et al., 2016;).

No Brasil, foi detectada pela primeira vez em plantas de tabaco no Rio Grande do Sul, por Von Parseval em 1922, e hoje está presente em todos os estados brasileiros sendo responsável por expressivos declínios de produtividade em culturas agronomicamente importantes (TAKATSU; LOPES, 1997; GAMA et al., 2016).

O gênero *Ralstonia* pertence à subdivisão beta das Proteobactérias, são bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes, se movimentam pela presença de um ou mais flagelos, estritamente aeróbicos, e capazes de produzir pigmento marrom difusível quando cultivadas *in vitro* (BRINGEL; TAKATSU; UESUGI, 2001; AGRIOS, 2005). Quando cultivados em meio de cultura, os isolados virulentos formam colônias de coloração branca, retas, irregulares e fluídas, enquanto as formas não-virulentas são pequenas, circulares, não fluidas e de cor branco-creme (MORAIS, 2015).

São vasculares, e possuem a capacidade de penetração através de tecidos emergentes ou aberturas mínimas nas raízes. O inóculo pode ser disseminado através do solo, água, materiais de propagação como tubérculos, rizomas e mudas

infectadas, com exceção de alguns isolados de bananeira, que infectam as partes florais e aparentemente são transmitidos através de insetos (HAYWARD, 1991).

Sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença, se constata inicialmente o escurecimento vascular, sendo mais visível na região próxima ao colo, perda de turgescência das folhas superiores devido a deficiência de transporte de água das raízes até a parte aérea, atrofia e murcha até a morte da planta infectada (MORAIS, 2015).



Figura 1. Sintomas característicos de murcha bacteriana, nas folhas e na haste. Fonte: Defesa vegetal, <http://www.defesavegetal.net/ralstonia-solanacearum>.

Um dos principais fatores de virulência, o exopolissacarídeo, também é responsável pelo processo de colonização bacteriana das plantas e pela oclusão dos vasos do xilema, que culmina com os sintomas de murcha (PEETERS et al., 2013).

São responsáveis por infectar diversas plantas, dicotiledôneas e monocotiledôneas, distribuídas em regiões de clima temperado, tropical e subtropical, sendo as principais espécies afetadas no Brasil as Solanaceae, como batata, tomate, pimentão, berinjela, tabaco, entre outras (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2008).

As perdas econômicas decorrentes da murcha bacteriana variam de acordo com a cultura hospedeira, e chegam a pelo menos 1 bilhão de dólares por ano com um efeito devastador em culturas de base nos países em desenvolvimento (YANG et al., 2016).

O controle da murcha bacteriana é dificultado pelo fato do patógeno atuar nos vasos do xilema, devido à sobrevivência do patógeno no solo, na água e em mudas infestadas poder chegar à anos, e pelo fato do patógeno estar associado a

um grande número de espécies botânicas, e apresentar ampla variabilidade genética (LOPES,2005; REMENANT et al., 2010).

O melhoramento para a obtenção de cultivares resistentes é considerada a estratégia mais importante, no entanto, torna-se complicado devido à ausência de boas fontes de resistência nas espécies vegetais e à diversidade genética do patógeno (LOPES,2005; REMENANT et al., 2010).

Atualmente os principais métodos para controlar a murcha bacteriana são baseados em rotação de culturas, limpeza de implementos e controle químico, entretanto, o controle químico induz a sucessivas ocorrências de cepas resistentes a pesticidas e aumenta as preocupações com o meio ambiente, além da efetividade de tais métodos diminuir a longo prazo de aplicação (YULIAR; TOYOTA, 2015).

1.3 *Xanthomonas spp.*

O gênero *Xanthomonas* é um complexo grupo de fitobactérias patogênicas pertencente à subdivisão gama de Proteobactérias, incluindo vinte e sete espécies (GARRITY et al., 2007).

Globalmente, as espécies de tal gênero infectam pelo menos 125 monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas, incluindo árvores de fruto, solanáceas, brassicáceas e gramíneas (CHAN; GOODWIN, 1999)

Apesar da ampla gama de patógenos, as espécies de *Xanthomonas* são muito semelhantes fisiologicamente. As células são Gram-negativas, em formato de bastonetes, se movimentam pela presença de um flagelo polar e são organismos aeróbios. A maioria das espécies formam colônias de coloração amarelada, devido à produção de carotenóides fotoprotetores chamados xantomonadinas, e altamente mucóides na presença do exopolissacarídeo goma-xantana, importante para a patogenicidade e essencial para a sobrevivência das células bacterianas, oferecendo proteção contra radiação UV, congelamento e dissecação (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

A dispersão para outras plantas acontece de forma direta, ou seja, por meio de fatores como vento e chuva, material de colheita, trânsito de veículos e máquinas agrícolas, sementes contaminadas, ferimentos causados por insetos, e também pelo próprio colhedor (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Tais agentes patogênicos podem penetrar na planta através dos estômatos, colonizando os espaços intercelulares do mesófilo, ou através de hidatódios ou feridas, colonizando a planta em seu sistema vascular, e assim provocar uma grande variedade de sintomas que incluem necroses, cancrios e pintas, afetando diversos órgãos das plantas (CRUZ, 2009).

Embora o gênero tenha uma ampla gama de hospedeiros, cada espécie individualmente (e seus patovares) apresentam um leque de hospedeiros bastante restrito, marcado pela especificidade dos locais de entrada na planta e pelos tecidos infectados (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

Portanto, a base da classificação dos membros do gênero *Xanthomonas* é a especificidade de seus hospedeiros, e são caracterizadas por causar doença em plantas taxonomicamente relacionadas, sendo a maioria culturas de base e com importância econômica (BANSAL et al., 2017).

1.3.1 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xct) (SHAAD et al., 2006) é o agente etiológico do cancro cítrico, doença que acomete todas as variedades de citros importantes comercialmente, causando grandes perdas econômicas para os produtores em todo o mundo, e aumentando os custos da produção para seu controle e prevenção (FERRAREZI et al., 2016).

A doença foi reportada pela primeira vez na Índia em 1830 (FAWCETT; JENKINS, 1933 apud AMORIM; BERGAMIM FILHO, 2001), e atualmente se encontra distribuída em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil está presente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Roraima (MAPA,2016).

A invasão e a colonização do hospedeiro acontece através da penetração por estômatos ou feridas e invasão do espaço apoplástico de folhas, ramos e frutos. Os sintomas são caracterizados por lesões circulares e eruptivas nos frutos e galhos, sendo visíveis dos dois lados da folha, resultantes dos fenômenos de hipertrofia e hiperplasia das células hospedeiras em resposta à doença. Em estágios mais avançados os danos podem parecer como halo de coloração escura,

resultando na desfolha prematura, queda de frutos, morte do tecido foliar e declínio geral da planta (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; MOREIRA et al., 2004; DOCENA, 2006; MASSARI; BELASQUE-JÚNIOR, 2006).



Figura 2. Sintomas característicos do cancro cítrico em frutos e folhas. Fontes: FUNDECITRUS, 2016 e “The American Phytopathological Society”, <http://www.apsnet.org/publications/Pages/default.aspx>.

A bactéria é facilmente disseminada da superfície de lesões até atingir plantas não infectadas em condições de alta temperatura, chuvas e ventos fortes (MASSARI; BELASQUE-JÚNIOR, 2006).

Foram estabelecidas as leis quarentenárias nos principais países produtores de citros que expõe delimitações para o comércio mundial e a importação de frutas cítricas provenientes de países ou regiões com cancro cítrico (MAPA, 2016).

Não existe controle eficiente para a doença até o momento, e as medidas gerais para seu manejo incluem a pulverização com cobre que reduz os sintomas, controle da larva mineradora e a eliminação de plantas vivas sintomáticas, visando eliminar a fonte de inóculo da área (MASSARI; BELASQUE-JÚNIOR, 2006).

Desde 2010, mudanças na legislação tornaram obrigatória a eliminação apenas de plantas sintomáticas, e avaliações trimestrais para o controle da doença em todas as plantas de citros da propriedade, o que resultou no enorme aumento da doença e na perda de produção (FUNDECITRUS, 2013; LACERDA et al., 2017).

1.3.2 *Xanthomonas euvesicatoria*

Xanthomonas euvesicatoria (JONES et al., 2004) é o agente responsável pela mancha-bacteriana, uma das doenças mais importantes e destrutivas do Brasil em tomateiro para processamento industrial (BARBOSA, 1997).

A doença foi observada pela primeira vez em 1914 em plantas de tomate na África do Sul, porém foi chamada como cancro do tomate. No Brasil, foi relatada primeiramente por Batista em 1947 na região Nordeste, causando prejuízos em mudas e plantações de pimentão e, um pouco mais tarde, no estado do Rio de Janeiro. Hoje está presente em todas as regiões produtoras de tomate do mundo (JONES; STALL; BOUZAR, 1998).

A mancha bacteriana é caracterizada de grande importância em plantações de tomate com temperaturas de 20° a 30° associada a chuva e ventos fortes (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005). Além do tomateiro, outras plantas podem ser hospedeiras dentro da família Solanaceae, como o pimentão, pimenta e batata (JONES; STALL; BOUZAR, 1998).

A bactéria pode sobreviver em restos culturais, porém não sobrevive no solo por longos períodos. É introduzida numa cultura através de sementes infectadas, e após a germinação das plantas atinge folhas e cotilédones, se alastrando rapidamente através da água de chuva ou irrigação. Aberturas naturais, danos mecânicos ou causados por insetos e abrasão nas folhas e tecidos permitem a penetração de bactérias na planta (RODRIGUES NETO, 2000).

Os sintomas acometem toda a parte aérea da planta, e podem se manifestar em qualquer estágio da cultura. Ocorre redução da área foliar fotossintetizante, o que causa a queda de flores e compromete a produtividade da cultura reduzindo o valor comercial dos frutos. Os primeiros sintomas aparecem como pequenas áreas encharcadas com formato irregular, formando lesões necróticas maiores com aspecto seco, podendo coalescer e provocar amarelecimento e morte das folhas, o que expõe os frutos à radiação solar (GITAITIS et al., 1992; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Normalmente, os sintomas são observados nas folhas baixas, até atingirem toda a parte aérea da planta. Nas peças florais o ataque resulta em sérios declínios de frutificação. Em frutos, aparecem manchas levemente elevadas, esbranquiçadas e posteriormente marrom escuras (KUROZAWA e PAVAN, 1997; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Em tomates, a mancha bacteriana não leva à queda das folhas, como ocorre com pimentão. Com o coalescimento das lesões foliares, ocorre a secagem e a destruição da folhagem a partir da parte inferior da planta, favorecendo o aparecimento de frutos com sintomas de queima do sol (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).



Figura 3. Sintomas característicos de mancha-bacteriana, em folhas e frutos de tomateiro. Foto: Alice Quezado-Duval.

Estudos mais recentes demonstraram que o indutor de resistência acibenzolar-S-metil, componente de um agrotóxico registrado para mancha-bacteriana do tomateiro pode ser eficiente no controle, desde que respeitadas dosagem, volume e intervalo de aplicação (HUANG et al., 2012; PONTES, 2012).

Sementes são uma importante fonte de disseminação a longas distâncias, portanto recomenda-se o uso de sementes sadias para um manejo preventivo, assim como irrigação localizada e rotação de cultura (GOODE; SASSER, 1980).

O manejo para controlar a doença é difícil e encontra dificuldades, devido a eficiência variável do controle químico, como produtos cúpricos, ausência de variedades resistentes ou com tolerância elevada, rápida disseminação do patógeno em condições favoráveis de altas temperaturas (24° - 30°), e

disseminação a longas distâncias por sementes contaminadas que servem como fonte de inóculo e meio para sobrevivência da bactéria por longos períodos (HUANG et al., 2012; PONTES, 2012).

1.4 *Agrobacterium* spp.

Agrobacterium é um gênero de fitobactérias tipicamente do solo. Muitas espécies são patogênicas e causam doenças como galha da coroa, porém também existem espécies avirulentas. Pertencem à classe alfa das Proteobactérias, são Gram-negativas, não formam esporos e possuem a forma de bacilos, com um a seis flagelos peritríquios. Em geral são aeróbias, porém alguns isolados podem ter respiração anaeróbia (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

As colônias em meio de cultivo normalmente são convexas, circulares, lisas, apigmentadas ou de coloração levemente creme. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 a 28°C (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

No Brasil, os primeiros relatos de doenças causadas por espécies de *Agrobacterium* spp. surgiram na década de 70, no estado de Minas Gerais. Atualmente existem relatos de sérios danos causados por *Agrobacterium* spp. em vários estados do Brasil, especialmente em roseiras (*Rosa* sp.) e videiras (*Vitis vinifera*L.) (ROMEIRO, 2005).

As diferentes espécies descritas dentro do gênero *Agrobacterium* ocorrem em todo o mundo, sendo mais facilmente encontradas em regiões de clima temperado devido à sua sensibilidade às altas temperaturas, em quase todos os tipos de solos, cultivados ou não, e são encontradas principalmente nas galhas, raízes ou no solo adjacente, em geral na rizosfera das plantas contaminadas (LIPPINCOTT; LIPPINCOTT; STARR, 1981).

Bactérias do gênero *Agrobacterium* infectam mais de 600 espécies vegetais. A maioria delas pertence à classe das Angiospermas dicotiledôneas e Gimnospermas e, mais raramente, Angiospermas monocotiledôneas. A espécie *Agrobacterium tumefaciens* é a mais comum de ser encontradas nas infecções do

que as outras espécies patogênicas (de dez a 100 vezes) (DE CLEENE; DE LEY, 1976).

1.4.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (SMITH; TOWNSEND, 1907) são as espécies mais estudadas nesse gênero, e provocam uma doença conhecida como galha-da-coroa, que não é considerada uma doença de importância econômica no Brasil, mas o estudo desta impactou a ciência moderna por ser identificada como uma importante ferramenta nas técnicas de engenharia genética (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

A bactéria foi descrita pela primeira vez por Smith e Townsend (1907), como *Bacillus tumefaciens*. A galha da coroa, provocada pela infecção por *A. tumefaciens* foi primeiramente descrita por Aristóteles e Theophrastus na Antigüidade (SIEMENS; SCHIEDER, 1996).

No Brasil, a galha da coroa surgiu primeiramente em algumas propriedades em Minas Gerais, e depois, devido às práticas agrônômicas adotadas para esta cultura, como a propagação vegetativa e enxertia, ocorreu uma rápida disseminação do patógeno (ROMEIRO, 2005).

Na galha-da-coroa, as células vegetais infetadas por *Agrobacterium tumefaciens* adquirem a propriedade de multiplicarem-se de maneira autônoma, sendo resultado de um processo natural de transferência horizontal de genes, transferência de um segmento de DNA da bactéria para o genoma da célula hospedeira. As células vegetais passam a sintetizar proteínas que estimulam a divisão celular no sítio de infecção. Os conhecimentos gerados desde então culminaram com um entendimento bastante aprofundado desse parasitismo, sendo considerado atualmente um sistema-modelo para estudos das interações patógeno-hospedeiro em plantas (NESTER, 2015).

Essa doença caracteriza-se pela formação de galhas na coroa, que é tipificada pela formação de tumores indiferenciados na coroa da planta (a zona de transição subterrânea para aérea, ou diretamente nas raízes da planta infectada (SUBRAMONI et al., 2014).



Figura 4. Sintomas característicos da galha-da-coroa. Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/10978505/>, <http://arquivo.ufv.br/petbio/informativos/abril2006/artigo02.htm>.

Essas bactérias provocam crescimentos neoplásicos, isto é, divisões celulares não controladas, em diversas espécies de plantas com importância econômica e na agricultura, incluindo plantas ornamentais como as rosas, uvas, cerejeiras, nozes, herbáceas perenes, entre outras (SUBRAMONI et al., 2014; LACROIX; CITOVSKY, 2016).

O patógeno vegetal possui a capacidade de transferir para as células vegetais susceptíveis um segmento de DNA oncogênico transportado num megaplasmídeo denominado plasmídeo indutor de tumor ou plasmídeo Ti. As cepas não patogênicas não possuem os plasmídeos completos ou possuem formas mutantes de plasmídeos ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

As principais medidas de manejo da doença são feitas através de uma boa higienização de plantas para obtenção de mudas saudias, e controle biológico com cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas geneticamente. O controle do tumor da galha é difícil de ser feito devido à falta de tratamentos químicos contra a bactéria (GAMA et al., 2016).

Os compostos a base de cobre e os antibióticos utilizados como tratamento químico às fitobactérias, embora de alta eficácia, precisam ser utilizados com precaução devido a fitotoxicidade, acúmulo do elemento cobre no solo, e o potencial da emergência de bactérias resistentes (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Devido às limitações dos métodos de controle químico utilizados atualmente, e diante da gravidade das infecções bacterianas em culturas comerciais, da facilidade e rapidez de disseminação, das dificuldades no controle e erradicação e da ausência de cultivares comerciais resistentes, existe a necessidade urgente de desenvolver novos agentes que efetivamente controlem as fitobactérias e não causem resistência.

1.5 Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês Antimicrobial Peptides) são oligopeptídeos com número variável de aminoácidos, podendo ir de cinco a mais de cem unidades, possuem baixa massa molecular, e apresentam atividade inibitória a vários patógenos (BAHAR; REN, 2013; MORAIS, 2015).

O descobrimento dos primeiros peptídeos antimicrobianos se deu em 1939, quando extraíram um agente antimicrobiano de *Bacillus brevis* contaminante de solo, e verificaram a eficácia em proteger camundongos contra a infecção por pneumococci. No ano seguinte, o extrato foi identificado como gramicidina (BAHAR; REN, 2013).

Em 1941 outro AMP foi descoberto e teve sua eficácia comprovada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, denominado tirocidina. Entretanto, apresentou certa toxicidade para células sanguíneas humanas. No mesmo ano, um peptídeo isolado da planta *Triticumaestivum*, que posteriormente foi denominado purotionina, apresentou efetividade contra fungos e algumas bactérias patogênicas (BAHAR; REN, 2013).

AMPs naturais podem ser encontrados em procariotos (bactérias) e eucariotos (fungos, plantas, insetos, animais, etc). Acredita-se que em muitos animais podem ser a primeira linha de defesa da imunidade inata contra diversos patógenos, e em plantas formam um sistema de defesa similar à imunidade inata de animais. Portanto, os AMPs apresentam um papel importante no controle de diversas infecções antes mesmo que apareçam os sintomas (GABAY, 1994; GALLO et al., 2002; BAHAR; REN, 2013).

Os AMPs tornam-se uma ótima fonte de potenciais agentes terapêuticos devido ao eficiente e amplo espectro de atividades contra uma variedade de patógenos em virtude de suas propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas (MORAIS, 2015; GUELL et al., 2016; ALMAAYTAH et al., 2017).

A maioria dos AMPs são catiônicos e anfipáticos com carga líquida positiva variando de +1 a +9, e com aproximadamente 30% de resíduos hidrofóbicos em proporção aos aminoácidos totais. Os resíduos de aminoácidos carregados positivamente são separados por regiões hidrofóbicas que permitem que eles se dobrem em conformações anfifílicas e anfipáticas durante o contato com membranas, podendo apresentar diferentes configurações, alvos, e mecanismos de ação como funções antibióticas, neurotransmissoras, toxinas, entre outras. (ZASLOFF, 2002; HANCOCK; SAHL, 2006).

Os AMPs são divididos em grupos baseados em seu tamanho, estrutura secundária e terciária, e em relação à presença ou ausência de pontes de dissulfeto. Os AMPs podem exibir as seguintes estruturas secundárias: alfa-hélice, folha-beta, estendida e laço, sendo as duas primeiras as mais comuns (POWERS; HANCOCK, 2003).

Os peptídeos que formam estruturas em alfa-hélice são compostos por peptídeos que apresentam hélices anfipáticas em membrana, e os peptídeos que apresentam padrão folha-beta geralmente são estabilizados por pontes de dissulfeto e apresentam estrutura rígida (POWERS; HANCOCK, 2003).

Alguns AMPs podem ser ricos em resíduos de cisteína, ricos em aminoácidos regulares, compostos por aminoácidos raros e modificados, conter dois componentes estruturais diferentes e muitos podem formar sua estrutura ativa apenas quando entram em contato com a membrana da célula alvo (MORAIS, 2015).

Os modelos de atuação dos peptídeos sugerem que o mecanismo principal ocorre através da interação eletrostática com os fosfolípidos aniônicos da camada de lipopolissacarídeos em membranas celulares, comprometendo sua integridade física, e causando o extravasamento do conteúdo celular. Como a camada dos

eucariotos é rica em colesterol e possui baixas cargas aniônicas, estão fora do alvo dos AMPs (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Após essa interação, ocorre a permeabilização da membrana através de três modelos principais (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). O modelo de aduelas descreve a formação de canais ou poros transmembrana através de moléculas em α -hélices anfipáticas, em que as suas superfícies hidrofóbicas interagem com o núcleo lipídico da membrana e suas superfícies hidrófilas posicionam-se internamente, produzindo um poro aquoso (MATSUZAKI et al., 1998).

No modelo tapete, os peptídeos se inserem perpendicularmente formando um tapete de moléculas sobre a superfície da membrana, porém com uma ação “detergente”, resultando na desestruturação total da membrana plasmática e a formação de micelas à partir da membrana rompida (SHAI, 1999).

O modelo de poros toroidais é descrito através das hélices dos peptídeos antimicrobianos inserindo-se na membrana e induzindo ao dobramento das monocamadas lipídicas através dos poros, de modo que estes ficam revestidos tanto pelos peptídeos inseridos como pelas cabeças lipídicas dos fosfolipídios. Esse modelo difere do primeiro apresentado, uma vez que, nos poros toroidais, os peptídeos sempre estão associados à cabeça lipídica da membrana, mesmo se forem inseridos perpendicularmente à bicamada (MATSUZAKI et al., 1996).

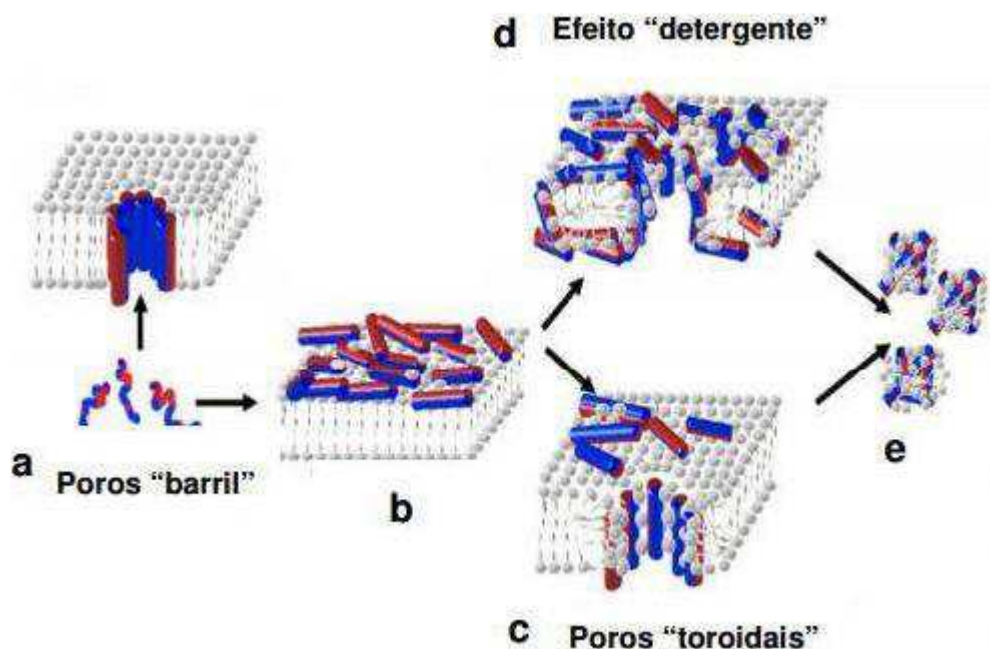


Figura 5. Modelo de ação mais conhecidos dos AMPs: (a) formação de poros do tipo “barril” (b) formação de um “tapete” de peptídeos na superfície da membrana, (c) formação de poros do tipo “toroidais”, (d) ação do tipo “detergente” com a desestruturação total da membrana plasmática (e) formação de micelas resultantes dos dois últimos mecanismos (BROGDEN, 2005).

Esses modelos de atuação constituem os mecanismos mais comuns e melhor descritos para os AMPs e, em geral, peptídeos que atuam através destes modelos de ação possuem capacidade de matar bactérias de forma rápida e em concentrações muito baixas (micromolares) (LOEFFLER; NELSON; FISCHETTI, 2001).

Em alguns casos, os AMPs já se mostraram efetivos contra linhagens resistentes a diversas outras drogas, uma vez que diferem-se estruturalmente dos antibióticos convencionais, (MUÑOZ; LÓPEZ-GARCÍA; MARCOS, 2007), e atuam através da interação com a membrana bacteriana, e portanto torna improvável que bactérias desenvolvam resistência aos AMPs, uma vez que, para tal, estas deveriam redesenhar suas membranas (GUELL et al., 2016; ALMAAYTAH et al., 2017).)

Apesar da resistência por parte dos organismos frente aos AMPs ser improvável, esta pode ser adquirida através da síntese de proteases, capazes de degradar peptídeos, ou ainda mediante a ligação dos AMPs a certos envoltórios ou

compostos celulares que reduziram seu efeito. Visto isso, os AMPs também devem ser usados com cuidado e sensatez, assim como os antibióticos convencionais (GUELL et al., 2016; ALMAAYTAH et al., 2017).

Devido a sua composição, é relativamente fácil modificar a estrutura e imobilizar AMPs em superfícies. É possível fazer peptídeos totalmente sintéticos através de síntese química ou utilizando sistemas de expressão recombinante. As fontes artificiais de AMPs são úteis para modificar AMPs existentes e desenhar novos AMPs sintéticos. Tais modificações tem o poder de mudar os alvos dos AMPs e melhorar sua estabilidade frente as proteases (BAHAR; REN, 2013.).

1.5.1 Peptídeos antimicrobianos no controle de fitopatologias

Visando a proteção das plantas, para controlar fitopatógenos e reduzir drásticas perdas na produção agrícola, o manejo de fitopatologias é feito através do uso de agrotóxicos, que estão sujeitos a fortes restrições e requisitos regulamentares, sendo muitas vezes tóxicos e/ou carcinogênicos, e se usados excessivamente, podem gerar graves problemas ambientais. Além disso, a eficácia pode ser comprometida devido ao surgimento de linhagens resistentes em detrimento do uso contínuo.

O ideal seria que os produtos a serem aplicados em alimentos apresentassem elevada ação antimicrobiana aliada à segurança alimentar e ambiental, e assim garantindo vantagens frente aos agrotóxicos.

A ação dos AMPs contra patógenos foi proposta desde sua descoberta, e muitos AMPs derivados de animais já foram avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto ao seu potencial de proteção de plantas contra patógenos (MORAIS, 2015).

No entanto, o desenvolvimento de compostos ativos para a agricultura deve apresentar alguns requisitos principalmente devido à toxicidade intrínseca e à baixa estabilidade, bem como a viabilidade econômica, no intuito de prover compostos menos tóxicos e mais estáveis, além de produzi-los em larga escala a custos reduzidos.

A ação de AMPs na proteção de plantas através da pulverização foi proposta por vários autores (ZEITLER et al., 2013; KEYMANESH; SOLTANI; SARDARI, 2009); como exemplo o estudo de Che et al. (2011), que pulverizou preventivamente plantas de tabaco, tomateiro e plantas de arroz com uma proteína quimérica contendo os domínios ativos da melitina e da cecropina A (Hcm 1). E os resultados foram satisfatórios quanto à resistência, após a inoculação artificial de *Tobacco mosaic virus*, *Ralstonia solanacearum* e *Magnaporthe grisea*, e propuseram o uso dessa quimera como ingrediente ativo de agrotóxicos.

A aplicação de AMPs na agricultura vem sendo estudada como uma alternativa para o controle de doenças microbianas que ainda são desafiantes para serem combatidas.

1.5.2 Epsilon-Poli-L-lisina

ϵ -Poli-L-lisina (ϵ -PL) é um homopolipeptídeo linear, composto geralmente por 25 a 35 resíduos idênticos de L-lisina e possui uma estrutura única caracterizada pela ligação peptídica de monômeros de lisina nos grupos funcionais ϵ -amino e grupos carboxil (HIRAKI, 2000).

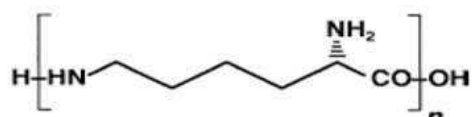


Figura 6. Fórmula química da ϵ -Poli-L-lisina (YOSHIDA; NAGASAWA, 2003).

Sabe-se que o homopolímero é biodegradável, solúvel em água, não tóxico, altamente estável a altas temperaturas, comestível, e é de grande interesse para as indústrias alimentícias e farmacêuticas, pela ampla atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (HIRAKI et al., 2003; YOSHIDA; NAGASAWA, 2003; GEORNARAS, 2007; NAJJAR; KASHTANOV; CHIKINDAS, 2007; TAKEHARA, et al. 2010; YE et al., 2013).

Em ensaios controlados de alimentação aguda e crônica de camundongos, o peptídeo se mostrou não tóxico, mesmo em concentrações relativamente altas.

Portanto, já é vastamente utilizada como conservante de alimentos em alguns países, como por exemplo no Japão, seu uso como preservante em alimentos é conhecido desde 1980 e considerado seguro a humanos (HIRAKI et al. 2003).

Derivados da ϵ -PL oferecem diversas aplicações como agente emulsificante, agente dietético, fibras biodegradáveis, hidrogéis, carreador de drogas, potenciador de agente anticancerígeno, e possui ainda funções biológicas específicas, como por exemplo, atividade antimicrobiana a bactérias Gram negativas e positivas, fungos e leveduras (CHHEDA; VERNEKAR; 2015).

A atividade antimicrobiana depende diretamente do comprimento da cadeia e do número de resíduos de L-lisina, porém tem sido demonstrado que são requeridos mais de 10 resíduos, para a atividade antibacteriana ser significativa (TAKEHARA, et al. 2010).

O principal organismo produtor de ϵ -PL através de fermentação aeróbica industrial é a bactéria filamentosa chamada *Streptomyces albulus*, isolada do solo. No entanto, existe a preocupação da degradação enzimática e induzida por aumento do pH do peptídeo secretado no meio de cultura (HIROHARA et al., 2006; OUYANG et al., 2006; WANG et al., 2011; CHHEDA; VERNEKAR; 2015), e por isso outros organismos tem sido explorados para a produção de ϵ -PL, como por exemplo o fungo *Epichloe sp.* MN-9 (NISHIKAWA; OGAWA, 2002), e a bactéria marinha *Bacillus subtilis* (EL- SERSY et al., 2012; SHUKLA; MISHRA, 2013).

O peptídeo é produzido por uma ϵ -PL sintetase ligada à membrana, e o comprimento de cadeia variável é decorrente da polimerização contínua de ϵ -PL que em qualquer momento pode difundir em solução tendo um número aleatório de resíduos (HYLDGAARD et al., 2014).

A lisina é um dos três aminoácidos básicos e possui um grupo ϵ -amino carregado positivamente, conferindo ao polímero de resíduos de lisina carga altamente positiva. Além disso, a ϵ -PL é composta por resíduos hidrofílicos, o que não permite a sua interação direta com regiões hidrofóbica de membranas. Em soluções polares, o polímero forma um composto com carboxil hidrofílico e grupos

amino no lado externo e grupos metileno hidrofóbico no interior (YOSHIDA; NAGASAWA, 2003).

A natureza catiônica da ϵ -Poli-L-lisina permite que ela iniba a formação de membranas celulares de um amplo espectro de microrganismos através da adsorção iônica do polipeptídeo catiônico com os grupos carregados negativamente da superfície celular (YOSHIDA; NAGASAWA, 2003).

O mecanismo proposto mais adequado que caracteriza sua ação é o modelo de tapete não-específico. Assim, a ϵ -Poli-L-lisina interfere diretamente na membrana celular numa reação que propõe incluir o rompimento da camada de lipopolissacarídeo (LPS) que gera a permeabilização da membrana externa, causando a distribuição anormal do citoplasma (HYLDGAARD et al., 2014).

Como a ϵ -PL interage mais prontamente com grupos carregados negativamente, pode-se considerar que sua toxicidade é relativamente baixa contra células de mamíferos e células de leveduras, e as diferenças de susceptibilidade entre os micro-organismos pode ser causada por diferenças na composição da membrana (HYLDGAARD et al., 2014).

O modo de ação do polípeptídeo catiônico também pode ser dificultado devido a diferenças na susceptibilidade para acessar a membrana. A habilidade para interagir com a membrana de bactérias Gram-negativas e remover a camada de LPS permite o acesso à membrana citoplasmática, uma vez que a camada de LPS atua como uma barreira contra diferentes peptídeos antimicrobianos catiônicos (COLVILLE et al., 2009; HYLDGAARD et al., 2014).

A atividade antibacteriana da ϵ -PL pode envolver outras reações além do rompimento da membrana celular. Muitos outros eventos já foram relatados como episódios antimicrobianos comuns causados por compostos catiônicos, como por exemplo, geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (YE et al., 2013).

Baseado nos resultados obtidos através dos experimentos de Microscopia eletrônica de transmissão e Microscopia de força atômica, e outros métodos moleculares (YE et al., 2013) o potencial mecanismo antimicrobiano da ϵ -Poli-L-lisina está retratado na Figura 7.

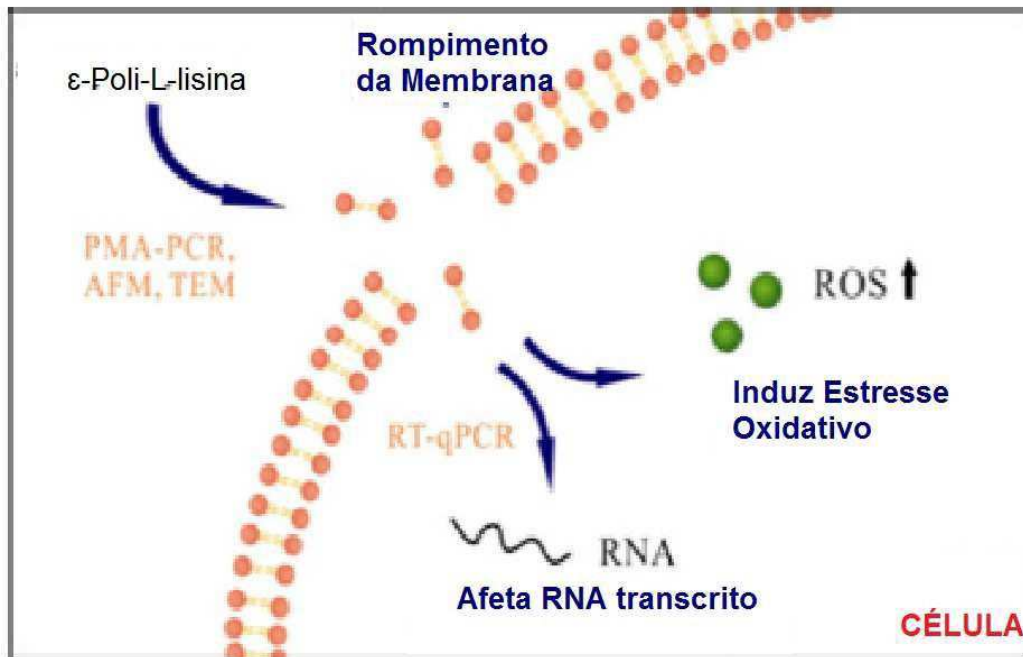


Figura 7. Potencial mecanismo antibacteriano da ϵ -Poli-L-lisina, em que é possível observar que através da atração eletrostática à superfície da membrana, ocorre um distúrbio na organização da membrana alvo, assim como alterações estruturais e fratura da membrana. A ϵ -Poli-L-lisina entra no citoplasma através de poros na membrana, e subsequentemente duas reações ocorrem, o aumento nos níveis de ROS e a interação com o DNA genômico, levando a morte celular (YE et al., 2013).

O acúmulo da interação da carga positiva do peptídeo em contato com a superfície da membrana da bactéria causa alterações na estrutura da membrana, além da indução de geração de ROS) e de um estado de estresse oxidativo (YE et al., 2013; DEL CARLO; LOESER, 2006).

Pode ocorrer também interação entre Epsilon-poli-L-lisina e o DNA genômico, e assim uma possível regulação do nível de expressão de genes. Todos esses fatores em sinergia afetam o estado da célula e finalmente resultam na morte da bactéria (YE et al., 2013).

A ϵ -Poli-L-lisina apresenta interessante atividade antimicrobiana frente diversos grupos de micro-organismos, e sua aplicação já está descrita na literatura em diversos ramos. Entretanto, faltam estudos que comprovem sua eficácia contra bactérias fitopatogênicas e o possível controle de doenças causadas por estas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estudar o potencial antimicrobiano da Epsilon-Poli-L-lisina contra os fitopatógenos *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas citri* e *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração mínima inibitória do peptídeo a partir da inibição do crescimento dos fitopatógenos.

Determinar o efeito bactericida da Epsilon-Poli-L-lisina em função do tempo.

Avaliar o efeito antimicrobiano da Epsilon-Poli-L-lisina na estrutura celular dos fitopatógenos.

Verificar a ação *in vivo* da Epsilon-Poli-L-lisina no controle da mancha bacteriana em plantas de tomate.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

A atividade antimicrobiana do peptídeo Epsilon-Poli-L-lisina foi testada contra as fitobactérias *Ralstonia solanacearum* isolado GMI1000, *Xanthomonas citri subsp. citri* isolado 306, *Xanthomonas euvesicatoria* isolado EH 2009-130 e *Agrobacterium tumefaciens* isolado C58. Estes organismos foram obtidos da Embrapa Hortaliças (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). As culturas estoque foram mantidas em meio Luria- Bertani (LB) Líquido (Extrato de Levedura, Triptona e Cloreto de Sódio) acrescido de 60% de glicerol mantidos a -80°C, e em água filtrada estéril mantidas a -4°C. Para uso, as bactérias foram repicadas em LB, incubados por 48h a 28°C.

3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) de um agente antimicrobiano é definida como a menor concentração utilizada para que o crescimento visível de um organismo seja inibido. Para obter os valores da CIM foram realizados ensaios de *Spotting*, através da difusão da solução do agente antimicrobiano a ser testado em placas de Petri com meio sólido e o micro-organismo. Os micro-organismos foram cultivados em LB a 28°C sob rotação (200 rpm) até atingirem a fase exponencial. A suspensão bacteriana foi ajustada a $OD_{600nm} 10^7$ Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) ml^{-1} .

Foram diluídos 10 microlitros da suspensão bacteriana em 90 microlitros de LB e em seguida plaqueados em LB e ágar para a formação de uma camada uniforme de bactéria. Dez microlitros da solução de peptídeo em cada concentração a ser testada foram pontuados na placa de ágar com a bactéria. As placas foram incubadas por dois dias a 28°C até o aparecimento dos halos de inibição (halos desprovidos de bactérias), para ser determinado o valor da CIM. A água foi utilizada como controle negativo, e o ensaio foi feito em duplicata.

3.3 Curvas de Mortalidade

A partir da determinação da CIM foram conduzidos ensaios de curva de mortalidade para acessar quantitativamente o efeito bactericida da Epsilon-Poli-L-lisina. As bactérias cresceram overnight, e a suspensão bacteriana foi ajustada a $OD_{600nm} = 0,1$, procurando manter a concentração de 10^3 a 10^5 UFC ml^{-1} . O peptídeo foi adicionado na suspensão bacteriana na concentração referente ao valor da CIM determinada, e a suspensão bacteriana sem o peptídeo foi avaliada como controle. As suspensões com e sem tratamento foram incubadas durante duas horas a 28°C sob rotação 200 rpm. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, diluídas em série com meio LB, e plaqueadas. As placas permaneceram incubadas por 48 horas a 28°C, e em seguida realizou-se contagem manual de

células bacterianas, a fim de avaliar eficiência do peptídeo em eliminar o patógeno no decorrer do tempo. O ensaio foi feito em triplicata.

3.4 Espectroscopia de Fluorescência

Para quantificar a fluorescência emitida pelas bactérias tratadas com o peptídeo e não tratadas foram realizados ensaios de espectroscopia de fluorescência. 5 ml da cultura bacteriana em meio LB foram mantidos em multiplicação sob rotação (200 rpm) a 28°C até a fase log, e em seguida a suspensão foi ajustada para 10^8 UFC ml⁻¹. Centrifugou-se a 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspendido em solução de ϵ -PL na concentração equivalente ao valor da CIM (tratamento), ou apenas em água para o controle. Incubou-se por 1 hora. Foi preparada também uma solução de água com Epsilon-Poli-L-lisina para o branco.

Foram adicionados 0,9 microlitros da mistura dos corantes A (SYTO 9 e iodeto de propídio) e B (iodeto de propídio) do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight Life Technologies em 300 microlitros das amostras a serem avaliadas (branco, tratamento e controle), e incubou-se 15 minutos no escuro. Foram realizadas as leituras do espectro de emissão de fluorescência (excitação 470 nm, emissão 490-700 nm) em fluorímetro da marca PerkinElmer. Avaliou-se também a emissão de fluorescência da suspensão de bactérias tratadas com Epsilon-Poli-L-lisina e não tratadas, sem adição de fluoróforos. Foram feitas duplicatas para cada amostra.

3.5 Microscopia de Fluorescência

Para a visualização das células viáveis e não viáveis coradas com os componentes do kit de viabilidade celular LIVE/DEAD foram produzidas imagens através de microscopia de fluorescência.

As culturas bacterianas foram cultivadas em LB sob rotação (200 rpm) a 28°C até atingirem a fase log de crescimento. Foram centrifugadas a 10.000 x g durante 15 minutos e o pellet foi ressuspendido em 2 ml de NaCl 0,85% para o

controle, e em 2 ml de solução de Epsilon-Poli-L-lisina na concentração referente ao valor da CIM para o tratamento. Incubou-se por uma hora. As etapas de centrifugação foram repetidas duas vezes, sendo que a ressuspensão do pellet foi feita em apenas 1 ml de NaCl para ambas as amostras.

Adicionou-se 3 microlitros da mistura dos componentes A (SYTO 9 e iodeto de propídio) e B (iodeto de propídio) do kit de viabilidade celular Live/Dead em 1 ml das suspensões bacteriana e foram incubados por 15 minutos no escuro. Em seguida as imagens foram obtidas em Microscópio da marca Evos e avaliadas visualmente quanto à proporção de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas).

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Alterações morfológicas na superfície das células bacterianas após o tratamento com a ϵ -Poli-L-lisina foram investigadas através dos ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura.

As células foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas de 12 mm em cada poço e com 2 ml de meio LB por poço, durante 24 horas. As células foram tratadas com solução de lisina como tratamento na concentração referente ao valor da CIM, ou água para o controle, e foram incubadas por uma hora. Após a incubação, foram fixadas às lamínulas com glutaraldeído 2,5% (v/v) *overnight* e mantidas em geladeira. No dia seguinte foram feitas 4 lavagens sucessivas (10 minutos cada) com tampão cacodilato 0,1M pH 7.2, uma fixação secundária em tetróxido de ósmio 1% (v/v) por 1 hora em temperatura ambiente, 3 lavagens (10 minutos cada) com tampão cacodilato, incubação em ácido tânico 1% durante 30 minutos, e 2 lavagens com água deionizada, antes de serem desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50-100% [v/v]) por 10 minutos cada. As amostras prosseguiram à secagem em ponto crítico e ao revestimento com partículas de ouro, em que as lamínulas foram fixadas em stubs de alumínio com fitas de carbono e as amostras foram revestidas com ouro a uma corrente de 50mA durante 120 segundos antes de serem examinadas utilizando o microscópio de varredura da marca Carl Zeiss modelo EVO MA 10.

3.7 Teste de Patogenicidade

O hospedeiro utilizado foi tomate Santa Cruz-Kada (*Lycopersicon lycopersicum*) cultivado em casa de vegetação com aproximadamente 25 dias. O isolado a ser testado foi *Xanthomonas euvesicatoria* EH 2009-130 cultivado em meio LB, e antes de ser inoculado foi ajustado a uma concentração de $OD_{600nm} = 0,5$ (10^9 UFC ml^{-1}) e diluído 100 vezes com solução de NaCl. Em seguida a solução foi pulverizada nas folhas até o ponto de escorrimento. 24 horas antes e depois da inoculação foi feita câmara úmida para ajudar na infecção. Os sintomas de mancha bacteriana apareceram após 10 dias.

3.8 Teste *in vivo*

X. euvesicatoria EH 2009-130 foi cultivada durante 48h a 28°C em meio LB e ágar. A suspensão bacteriana foi ajustada a 10^7 UFCs ml^{-1} com NaCl 85%, e foi inoculada por aspersão em plantas de tomate Santa Cruz-Kada com 30 dias. As plantas permaneceram em câmara úmida 24h antes e depois da inoculação, e foram mantidas em casa de vegetação. A fim de testar a atividade antimicrobiana da Epsilon-Poli-L-lisina *in planta* no controle da mancha-bacteriana causada por *X. euvesicatoria*, foram realizadas pulverizações da solução de lisina (1x e 2x CIM), água e surfactante Pentra-bark (1%) em toda área foliar de plantas de tomate. As pulverizações foram feitas dois dias antes da inoculação de *X. euvesicatoria* (preventivamente) ou dois dias após a inoculação (curativamente). A avaliação dos sintomas e do progresso da doença iniciaram a partir do aparecimento das primeiras manchas, e foram dadas notas de acordo com a escala diagramática para mancha bacteriana.

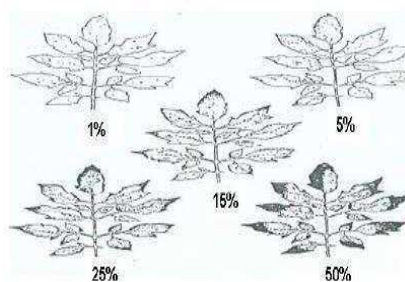


Figura 8. Escala diagramática para mancha bacteriana (*Xanthomonas spp.*) do tomateiro (MELLO; TAKATSU; LOPES, 1997).

3.9 Análises Estatística

As premissas necessárias para análise de variância (ANOVA) foram confirmadas. A normalidade do erro e a variância da homogeneidade foram avaliadas através do programa SPSS, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, ambos com nível de significância de 0,05. Posteriormente, o conjunto de dados foi submetido à ANOVA, utilizando o programa SISVAR. Os ensaios de curva de mortalidade foram analisados em um arranjo de parcelas em que a parcela principal corresponde à Epsilon-Poli-L-lisina, e a parcela dividida o tempo de incubação. Quando a interação significativa foi observada, as variâncias complexas foram aplicadas. As médias do tratamento com o peptídeo e as médias do tempo de incubação foram comparadas pelo teste de Tukey e a regressão polinomial, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de *Spotting*

A habilidade da Epsilon-Poli-L-lisina em inibir o crescimento microbiano foi validada através do ensaio de *Spotting in vitro*. O valor da CIM foi estabelecida de acordo com a menor concentração da solução do peptídeo aplicada no halo que não apresentou crescimento microbiano (Tabela 1). A Figura 9 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de *Spotting*.

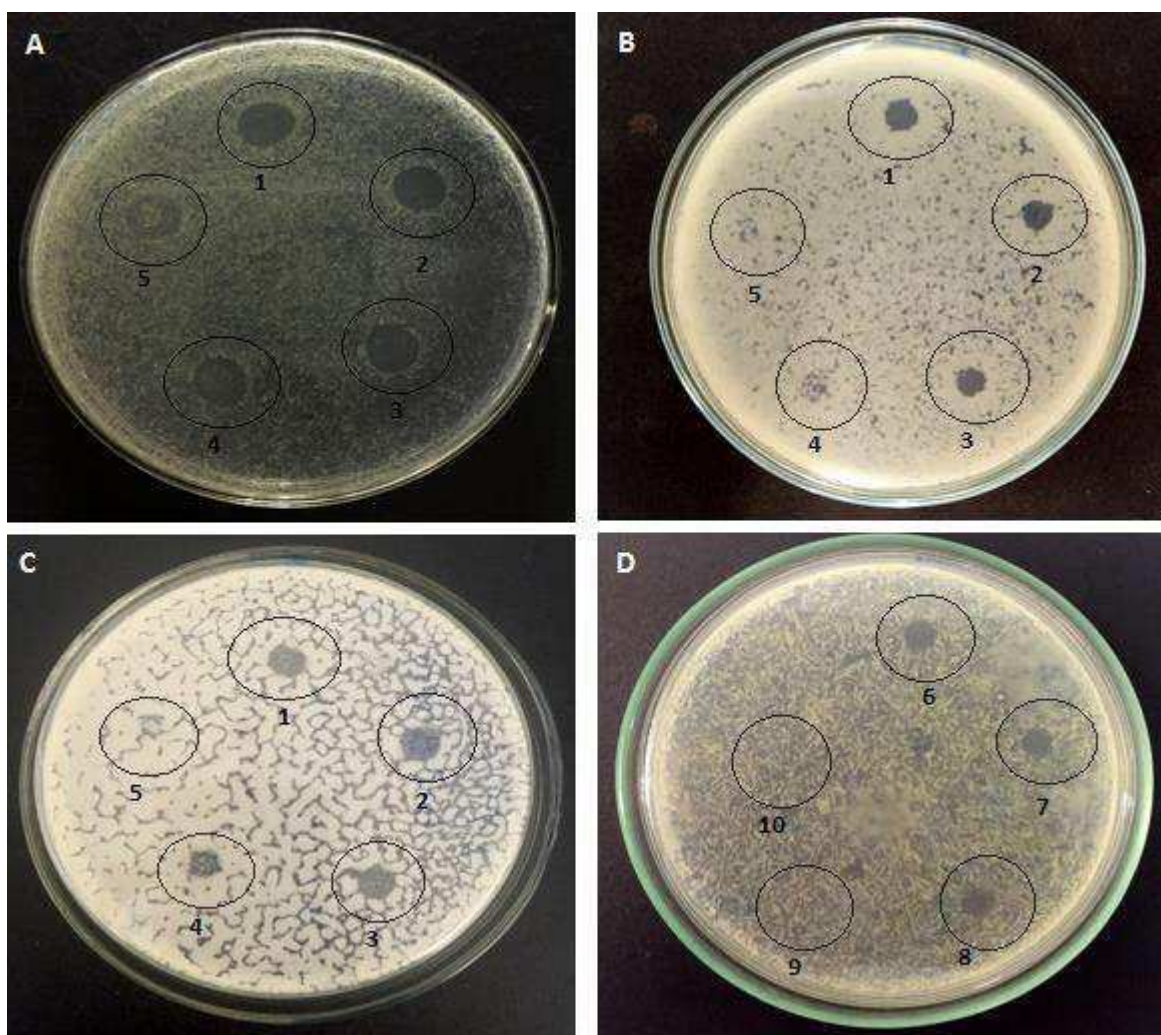


Figura 9. Ensaio de *Spotting* para determinar a concentração inibitória mínima do peptídeo ϵ -Poli-L-lisina contra as seguintes fitobactérias: *X. euvesicatoria* (A), *R. solanacearum* (B), *A. tumefaciens* (C) e *X. citri* (D).

Tabela 1. Concentrações de Epsilon-Poli-L-lisina testadas em cada ensaio de *Spotting*.

Número	Concentração de ϵ -Poli-L-lisina ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	1000
2	800
3	600
4	400
5	300
6	90
7	85
8	80
9	75
10	70

As concentrações mínimas inibitórias foram de 80 µg ml⁻¹ para *X.citri*, 400 µg ml⁻¹ para *A. tumefaciens*, e 600 µg ml⁻¹ para *R. solanacearum* e *X. euvesicatoria*, conforme indicado na Figura 9.

Os resultados do ensaio de *Spotting* mostram que o peptídeo ε-Poli-L-lisina apresenta atividade antibacteriana, e foi capaz de inibir o crescimento das fitobactérias, sendo que a menor concentração necessária foi para a inibição de *X. citri*, com CIM de 80 µg/ml⁻¹. Esses resultados indicam seu potencial uso com opção terapêutica no controle de doenças bacterianas.

Hyldgaard et al (2014) demonstraram o efeito antimicrobiano da Epsilon-Poli-L-lisina frente a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* e a Gram-positiva *Listeria innocua* através do monitoramento do crescimento celular em placas de microtitulação de 96 poços, e mediram o valor da OD_{620nm} a cada 20 minutos, durante 24 horas. Os valores da CIM foram definidos em 74 mg/L para *E. coli* e 750 mg/ L para *L. innocua*.

Shima et al (1984) estudaram a ação antimicrobiana da Epsilon-Poli-L-lisina contra diversos micro-organismos, entre eles as bactérias *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e os fungos *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*, através da metodologia de diluição em caldo, e os micro-organismos foram incubados durante 18 horas. Os valores da CIM foram de 128 µg/ml para *S. cerevisiae*, 3 µg/ml para *P. aeruginosa*, 4 µg/ml para *S. aureus*. Para os fungos os valores foram maiores que 256 µg/ml.

Estes resultados demonstram as variações na susceptibilidade dos diferentes organismos testados. Para entender melhor essas diferenças é necessário um entendimento mais profundo do mecanismo de ação do peptídeo, assim como da composição da membrana dos patógenos (KOEJNIK; LOCHER; VAN GELDER, 2000). Além disso, sabe-se que existe uma relação entre o peso molecular da ε-Poli-L-lisina e a atividade antibacteriana (SHIMA et al., 1984).

4.2 Curvas de mortalidade

Para confirmar a atividade bactericida *in vitro* do peptídeo, foram conduzidos ensaios de curva de mortalidade. As bactérias do grupo controle foram incubadas em LB. As bactérias tratadas foram incubadas com ϵ -PL na concentração referente aos valores da CIM. A cada 30 minutos, durante 2 horas, foram feitas diluições seriadas das suspensões bacterianas e plaqueadas em placas de Petri com ágar e LB. A contagem de colônias bacterianas foi realizada manualmente após 48 horas.

As médias de UFC mL⁻¹ foram obtidas a partir de testes independentes feitos em triplicatas. Foram feitas análises estatísticas no programa SISVAR para avaliar diferenças nos valores de UFCs obtidos em cada grupo, em função do tempo. Os dados estão apresentados nas tabelas e figuras abaixo.

Tabela 2- Médias de UFC mL⁻¹ obtidas *in vitro* para o tratamento (ϵ -PL) e controle em função do tempo¹ para *X. citri*.

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
ϵ -Poli-L-lisina	39133,33 a	337 a	1,33 a	130 a	5 a
Controle	39400,00 a	34633,33 b	47333,33 b	51333,33 b	58666,66 b

¹médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

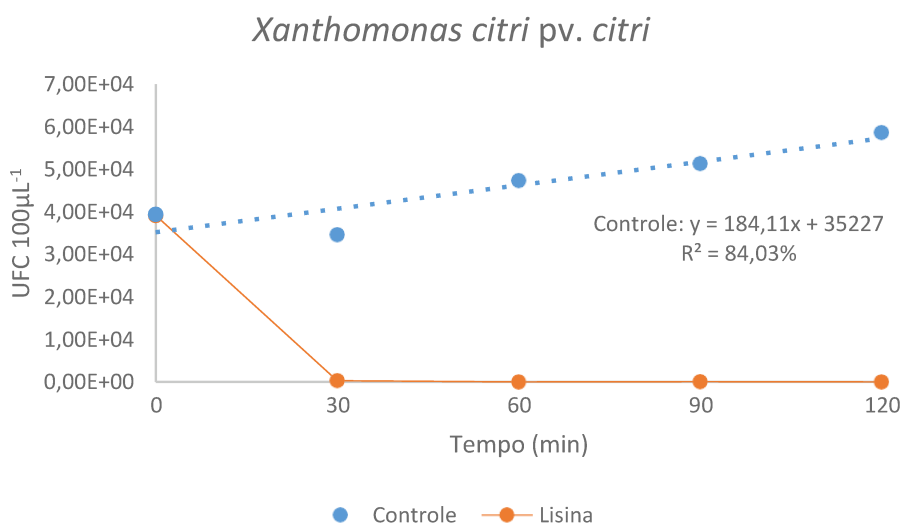


Figura 10. Curva de mortalidade para *X. citri* no tratamento com a ϵ -Poli-L-lisina.

De acordo com as médias apresentadas na tabela 2, a partir de 30 minutos é possível observar que as médias de UFCs tratadas com ϵ -Poli-L-lisina diferiram

estatisticamente das médias do grupo controle. Nos primeiros 30 minutos houve uma redução de 86% de UFCs no grupo de células que foram tratadas com o peptídeo, e de 97% no grupo de células que foram tratadas em comparação ao grupo controle, demonstrando a atividade bactericida do peptídeo. No decorrer das duas horas, apenas algumas colônias resistentes foram observadas. No grupo controle, o crescimento de *X. citri* aconteceu de forma linear em função do tempo.

Tabela 3- Médias de UFC mL⁻¹ obtidas *in vitro* para o tratamento (ε-PL) e controle em função do tempo¹ para *A. tumefaciens*

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
ε-Poli-L-lisina	7300 a	6,67 a	0 a	16,67 a	0 a
Controle	10366,67 a	11166,67 a	29200 b	38266,67 b	36000 b

¹médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

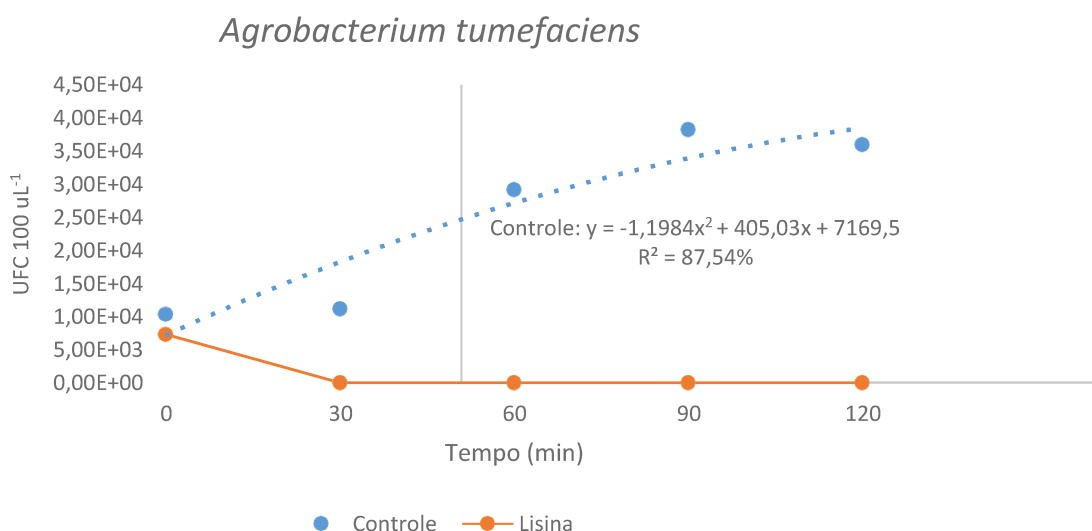


Figura 11. Curva de mortalidade para *A. tumefaciens* no tratamento com a ε-Poli-L-lisina.

Para *A. tumefaciens*, após 30 minutos de tratamento com o peptídeo, a redução no número de UFCs foi de aproximadamente 100% em relação ao tempo 0 minutos. No entanto, a diferença estatística entre as médias de UFCs nos dois grupos foi constatada a partir de 60 minutos de ensaio, indicando que para esta bactéria a diferença foi um pouco mais tardia. Durante as duas horas, a diminuição no número de colônias bacterianas se manteve, e em alguns momentos não ocorreu crescimento, confirmando assim a atividade bactericida da ε-Poli-L-lisina.

No grupo não tratado, o crescimento da *A. tumefaciens* mostrou seguir o padrão polinomial em função do tempo.

Tabela 4- Médias de UFC mL⁻¹ obtidas *in vitro* para o tratamento (ε-PL) e controle em função do tempo¹ para *X. euvesicatoria*.

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
ε-Poli-L-lisina	3100 a	0 a	0,67 a	1,33 a	1,33 a
Controle	5533,33 b	6233,33 b	5900 b	5866,67 b	9600 b

¹médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

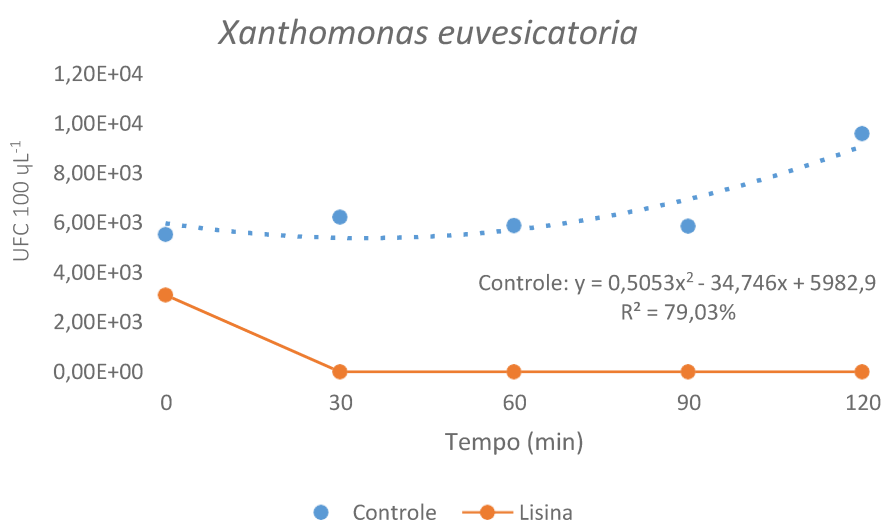


Figura 12. Curva de mortalidade para *X. euvesicatoria* no tratamento com a ε-Poli-L-lisina.

No tratamento de *X. euvesicatoria*, as médias de UFCs diferiram estatisticamente no início do ensaio, e pode-se pressupor que o peptídeo foi rapidamente eficaz na redução da carga microbiana. A partir de 30 minutos, a redução foi de 100% no crescimento microbiano de células tratadas com ε-Poli-L-lisina, demonstrando a eficácia da atividade bactericida do peptídeo. No entanto, na última hora do ensaio cresceram algumas colônias resistentes. Para o grupo sem tratamento com ε-PL, o crescimento das colônias seguiu o padrão polinomial em função do tempo.

Tabela 5- Médias de UFC mL⁻¹ obtidas *in vitro* para o tratamento (ϵ -PL) e controle em função do tempo¹ para *R. solanacearum*.

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
ϵ -Poli-L-lisina	120333,33 a	2283,33 a	2900 a	3170 a	4280 a
Controle	147333,33 a	135000 b	128000 b	273666,67 b	270333,33 b

¹médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Dados transformados segundo $\log(x+1)$.

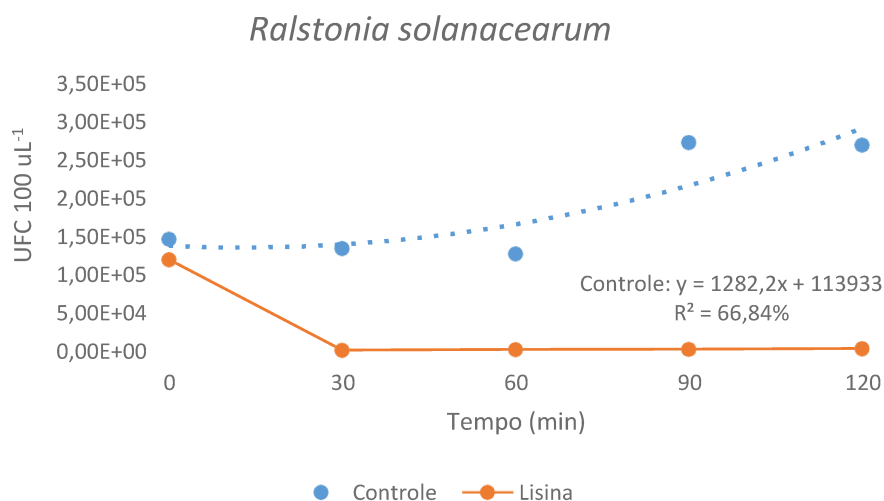


Figura 13. Curva de mortalidade para *R. solanacearum* no tratamento com a ϵ -Poli-L-lisina.

Para *R. solanacearum*, o peptídeo foi eficiente na redução do crescimento bacteriano *in vitro*, e a partir de 30 minutos ocorreram reduções drásticas nos valores de UFCs em comparação ao grupo não tratado. No final do ensaio, a redução no valor da média de UFCs foi de aproximadamente 70% em relação ao tempo 0, apresentando um efeito possivelmente bactericida sobre essa bactéria. No grupo controle as células apresentaram crescimento na forma polinomial em função do tempo.

A inibição do crescimento deve estar relacionada a perda de viabilidade celular. No entanto, deve-se levar em consideração a composição da membrana e da parede celular destes patógenos, e a estequiometria fosfolipídica por trás dos diferentes gêneros e espécies (YEAMAN; YOUNT, 2003).

Muitos peptídeos podem também se difundir no citoplasma, e alcançar alvos intracelulares. A diferença nesses alvos poderia ser outra razão plausível para a variável habilidade antimicrobiana (FJELL et al., 2011).

Zhao et al (2015) em estudos comparativos da atividade antimicrobiana da Epsilon-Poli-L-lisina e do copolímero de Epsilon-Poli-L-lisina e Epsilon-caprolactona acoplado a nanopartículas, verificaram que, após 8 horas de incubação com a Epsilon-Poli-L-lisina, o número de UFCs de *Staphylococcus aureus* se estabilizou em 10^8 , durante 17 horas. Para *Bacillus subtilis* o número de UFCs foi decrescente a partir do início da incubação com o peptídeo, e assim se manteve durante as 25 horas de ensaio.

Ye et al (2013) em estudos com *E. coli* O157:H7, verificaram a função antibacteriana do peptídeo ϵ -PL através do tratamento das células bacterianas com concentrações crescentes do peptídeo (5 μ g/ml a 50 μ g/ml), durante 15 horas, e observaram uma taxa de mortalidade acima de 95%.

Tais resultados corroboram com os dados encontrados por Hyldgaard et al (2014), que incubaram células de *E. coli* e *L. innocua* com ϵ -PL em concentrações equivalentes a $\frac{1}{2}$ da CIM, CIM e 2 vezes o valor da CIM, e observaram redução de UFCs de 2 a 3 log. Ao aumentarem a concentração do peptídeo para 2 vezes o valor da CIM, o efeito bactericida foi ainda mais rápido, e após 8 horas de ensaio nenhuma UFC foi observada, demonstrando uma redução de >5.5 -log.

Yang et al (2016) avaliaram o efeito inibitório de peptídeos naturais produzidos por plantas chamados hidroxicumarinas, contra *R. solanacearum*, em concentrações variando de 10 a 100 mg/L, e verificaram que após 24 horas de incubação, o crescimento microbiano praticamente cessou, nas concentrações de 50-100 mg/L.

Che et al (2011) estudaram o efeito antimicrobiano do peptídeo quimérico chamado Hcm1, constituído por Hpa1 unida aos domínios ativos da cecropina A e da melitina, e verificaram que esta proteína foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de diversas bactérias como por exemplo, *E.coli*, *R. solanacearum* e *Pseudomonas syringae*. Após 120 minutos de incubação com o peptídeo na concentração de 2 μ M, foi obtida 100% de mortalidade para *P. syringae*, e após 180 minutos, 90% de mortalidade para *R. solanacearum*.

Almaaytah et al (2017) obtiveram um AMP sintético homólogo ao AMP presente em veneno de escorpiões, através do consensus design, uma estratégia utilizada para aumentar a eficácia e estabilidade do peptídeo. Os ensaios de curva de mortalidade foram realizados com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Foram feitas contagens de células bacterianas viáveis em 3 diferentes tempos (60 min, 120 min e 480 min). Eles verificaram que o peptídeo foi capaz de eliminar 99% das células bacterianas entre 60 e 180 min, na CIM. Na concentração 2CIM, *E. coli*, *Salmonella enterica*, e *P. aeruginosa* foram eliminadas com 60 min de incubação, e a *Acinetobacter baumannii* foi totalmente erradicada com 30 min de exposição.

As curvas de mortalidade da Epsilon-Poli-L-lisina se mostraram equivalentes com aquelas obtidas para outros AMPs catiônicos, o que implica em sua ação bactericida efetiva e rápida contra patógenos bacterianos.

4.3 Espectroscopia de Fluorescência

A morte de uma célula bacteriana tem sido definida como a incapacidade de uma célula crescer como colônia visível em meios bacteriológicos. No entanto, existem vários indicadores de viabilidade que podem ser avaliados sem cultivar células. Esses indicadores são baseados principalmente em moléculas fluorescentes, que podem ser detectadas com microscopia de fluorescência, e emissão de fluorescência em fluorímetros (BERNEY et al., 2007).

A detecção de fluorescência é uma técnica válida para a quantificação de bactérias, além de ser rápida e confiável, e que permite acessar a viabilidade de diversos gêneros de bactérias (GUO et al, 2017).

A marcação de bactérias com os corantes fluorescentes SYTO 9 e iodeto de propídio (componente A) e iodeto de propídio (componente B), que se diferem tanto nas características espectrais quanto na capacidade de penetrar em células bacterianas saudáveis, permite uma distinção quantitativa confiável entre bactérias com a membrana citoplasmática intacta ou danificada, e diferenciação entre células vivas e mortas (BERNEY et al., 2007).

O componente A é permeável a membrana celular, e permanece retido dentro da célula levando a um aumento da fluorescência verde ao longo do corpo celular. O componente B é capaz de permear células que apresentam a membrana celular danificada, ou seja, em processo de morte, se ligam aos ácidos nucléicos e emitem fluorescência vermelha (STOCKS, 2004).

Na Figura 14 estão apresentados os gráficos originados das análises quantitativas em fluorímetro, e as respectivas imagens obtidas em microscópio de fluorescência estão exibidas na Figura 15.

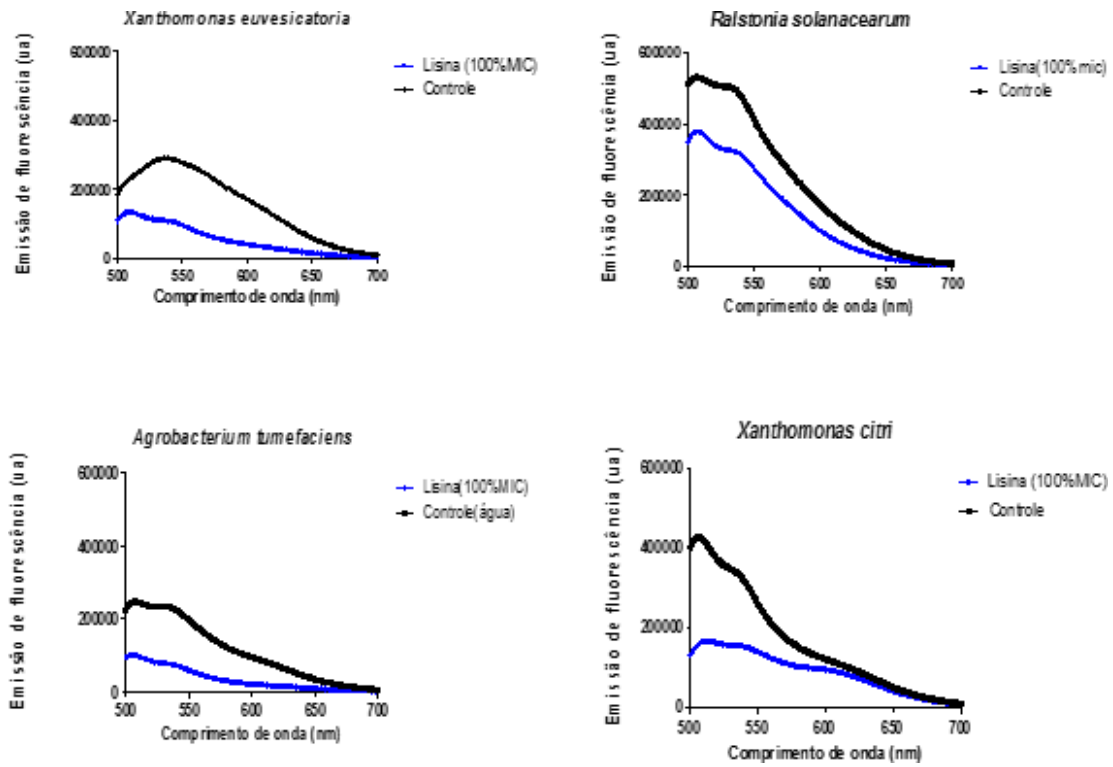


Figura 14. Espectro de emissão das análises de relativa viabilidade celular através de espectroscopia de fluorescência.

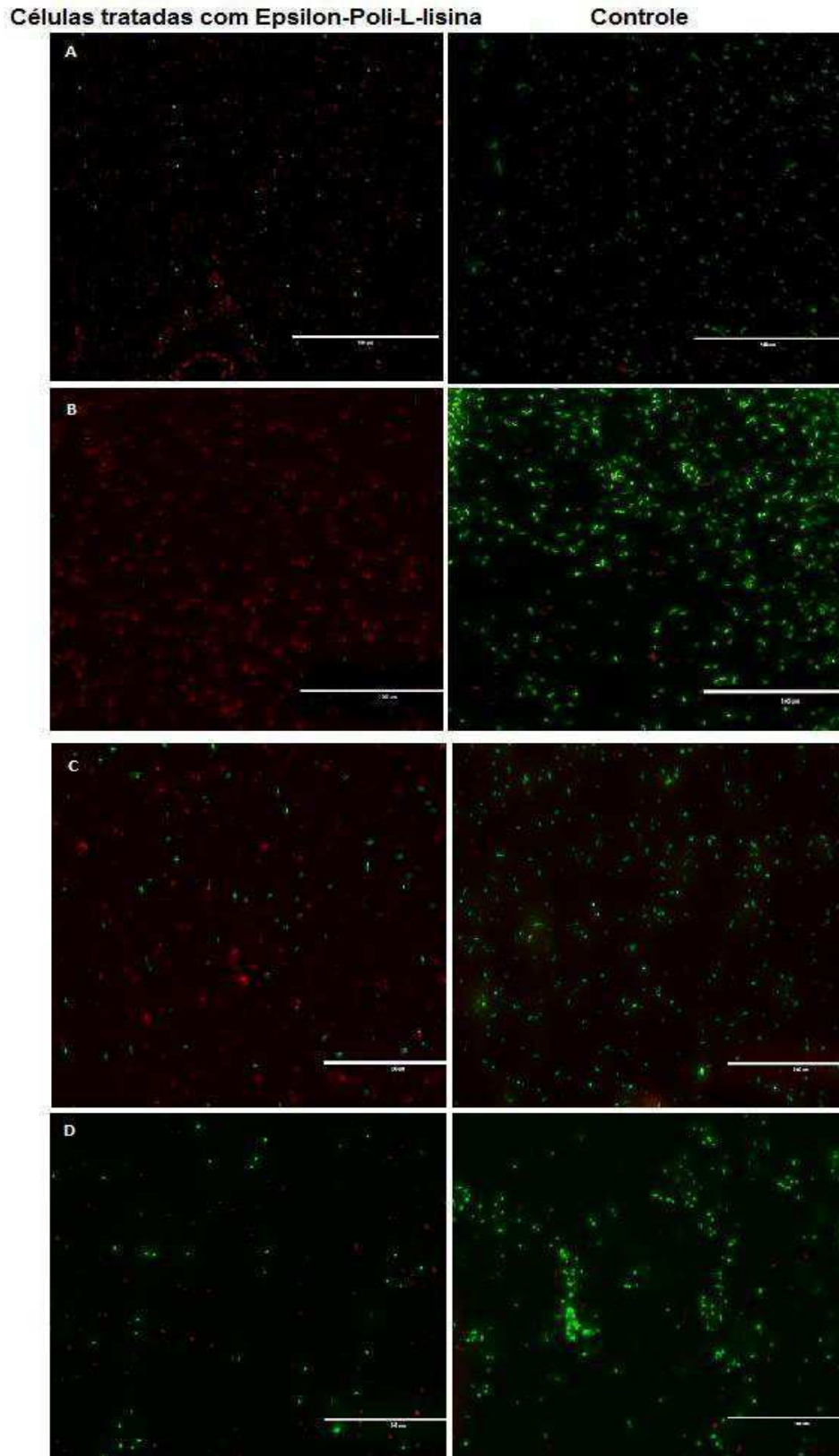


Figura 15. Sobreposição das imagens da fluorescência emitida pelas bactérias através da marcação com os componentes A e B em células tratadas com ϵ -PL (CIM) durante 1 hora e células não tratadas: *X. euvesicatoria* (A); *R. solanacearum* (B); *A. tumefaciens* (C); *X. citri* (D).

De acordo com o protocolo do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD, células marcadas com o componente A, que corresponde ao fluoróforo SYTO 9 e iodeto de propídio e representam as células viáveis, irão emitir fluorescência em um comprimento de onda próximo a 530 nm.

Os gráficos apresentados na Figura 14, relativos à emissão de fluorescência, demonstram que quando as células bacterianas foram tratadas com a Epsilon-Poli-L-lisina, a emissão de fluorescência foi menor no comprimento de onda próximo a 530 nm, o que indica que a quantidade de células viáveis é menor neste grupo.

As imagens obtidas pela microscopia de fluorescência (Figura 15) mostram que o tratamento de células bacterianas com o peptídeo Epsilon-Poli-L-lisina desencadeou considerável dano na membrana celular das bactérias, responsável pela emissão da fluorescência vermelha. Ao contrário do grupo controle, que apresenta quantidade de células fluorescentes verdes consideravelmente maior.

Hou et al (2010) estudaram peptídeos antimicrobianos lineares compostos por quantidades variáveis de arginina e triptofano e o efeito de suas atividades na formação de biofilme por *E.coli*. Após 24 horas de incubação com o peptídeo eles prosseguiram com os ensaios de microscopia de fluorescência, e observaram que quando as células foram tratadas com maiores concentrações do peptídeo, maior foi a quantidade de células vermelhas fluorescentes, o que indica que o peptídeo causou redução nas células de biofilme viáveis.

Em estudos avaliando os efeitos de diferentes peptídeos antimicrobianos na inibição do crescimento e nas alterações morfológicas dos micro-organismos *Methanobrevibacter smithii* e *Methanosphaera stadtmanae*, pertencentes ao domínio *Archaea*, Bang et al. (2012) demonstraram através de microscopia de fluorescência e marcação com os componentes do kit LIVE/DEAD que as células tratadas com 10 µM dos peptídeos LL32 (derivado do homem) e Lpep 19-2.5 (sintético) apresentaram aspecto dilatado após 10 minutos de tratamento, e o aumento de tamanho da célula levou ao estouro das membranas celulares.

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de confirmar se a integridade da membrana celular e a morfologia celular das fitobactérias foram afetadas pelo peptídeo Epsilon-Poli-L-lisina, foram

conduzidos ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para comparar células tratadas com o peptídeo na CIM, durante 1 hora, e células não tratadas.

Após o tratamento com a Epsilon-Poli-L-lisina, a membrana celular das bactérias demonstrou aparência de enrugamento e ruptura, e em alguns casos o extravasamento do citoplasma foi visível.

Ye et al (2013) obtiveram resultados similares ao tratar células de *E. coli* com 50 µg/ml de Epsilon-Poli-L-lisina durante 4 horas, e observar através de Microscopia Eletrônica de Transmissão que a membrana externa e o citoplasma das células estavam desarranjados, e o aspecto das células bacterianas se mostrou áspero, com rugas e rachaduras, e cercado por detritos celulares.

Zhao et al (2015) avaliaram o resultado da interação entre nanopartículas compostas por Epsilon-Poli-lisina e Epsilon-caprolactona e *S. aureus* e *B. subtilis*, e observaram a estrutura das bactérias antes e depois do tratamento com as nanopartículas na concentração de 100% do MIC durante 2 horas. A aparência quebradiça das bactérias, ruptura da parede e membrana celular, lise do conteúdo celular e extravasamento de citoplasma foram observados nas imagens obtidas através de MEV, coincidindo com os achados neste estudo.

Bang et al (2012) conduziram ensaios de MEV para avaliar os efeitos dos AMPs LL32 e Lpep 19-2.5 na conformação estrutural de *Methanobrevibacter smithii* e *Methanosphaera stadtmanae*. Eles observaram que, após 4 horas de tratamento com os AMPs nas concentrações referentes a CIM, as células tratadas com o AMP LL32 não demonstraram alterações em seu tamanho, membrana celular, e organização celular, porém algumas estruturas filamentosas originárias da camada externa foram observadas. Após o tratamento com Lpep 19-2,5, uma parte da camada externa foi separada da parede celular e expandida, e em algumas células, essa camada já estava destruída enquanto a parede celular ainda estava intacta.

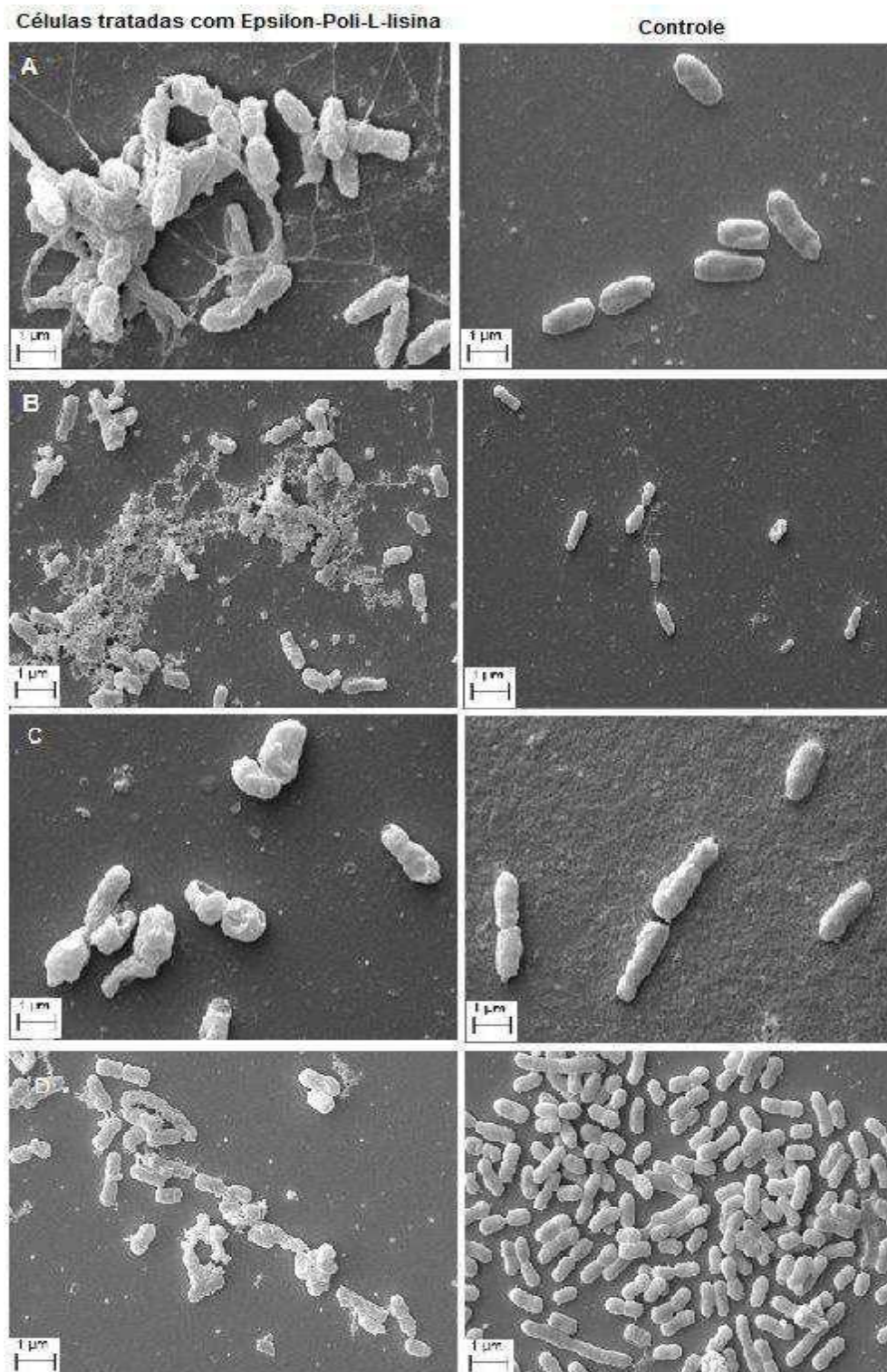


Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura: *X. euvesicatoria* (A); *R. solanacearum* (B); *A. tumefaciens* (C); *X. citri* (D).

4.5 Teste *in vivo*

Para avaliar a eficácia da Epsilon-Poli-L-lisina na prevenção do aparecimento de sintomas ou no controle do desenvolvimento da doença, foram realizadas pulverizações da solução do peptídeo, água e surfactante Pentra Bark em 48 plantas de tomate. 24 plantas foram pulverizadas 2 dias antes da inoculação, sendo 12 na concentração relativa a CIM e 12 na concentração 2xCIM. 24 plantas foram pulverizadas 2 dias após a inoculação, sendo 12 na concentração relativa a CIM, e 12 na concentração de 2xCIM.

Com 20 dias de inoculação, as plantas do grupo controle já apresentaram os sintomas iniciais da mancha bacteriana (Figura 17). Em comparação, a maioria das plantas que haviam recebido tratamento com ϵ -PL não demonstraram sintomas. No grupo tratado preventivamente na CIM, 3 plantas desenvolveram algumas manchas iniciais, porém as que receberam 2xCIM não apresentaram nenhum sintoma, o que indica que para o controle das fitobacterioses seja necessário aumentar a concentração.

Após 30 dias de inoculação, as plantas do grupo controle apresentaram sintomas mais severos, devido ao progresso da doença neste intervalo de tempo. Foi observado que plantas que receberam pulverização com a ϵ -PL desenvolveram alguns sintomas iniciais da mancha bacteriana, principalmente as que foram tratadas com a solução do peptídeo na CIM. O melhor resultado foi obtido para plantas tratadas preventivamente com 2xCIM, em que nenhum sintoma de doença foi observado.

A aplicação de AMPs em plantas já é conhecida. Che et al (2011) confirmaram que a pulverização da proteína quimérica Hcm1 3 dias antes da inoculação do micro-organismo reduziu a severidade dos sintomas causados por patógenos bacterianos, virais e fúngicos, em plantas de tomate, tabaco, e arroz, respectivamente. Tais resultados sugerem que a Hcm1 é uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos pesticidas.

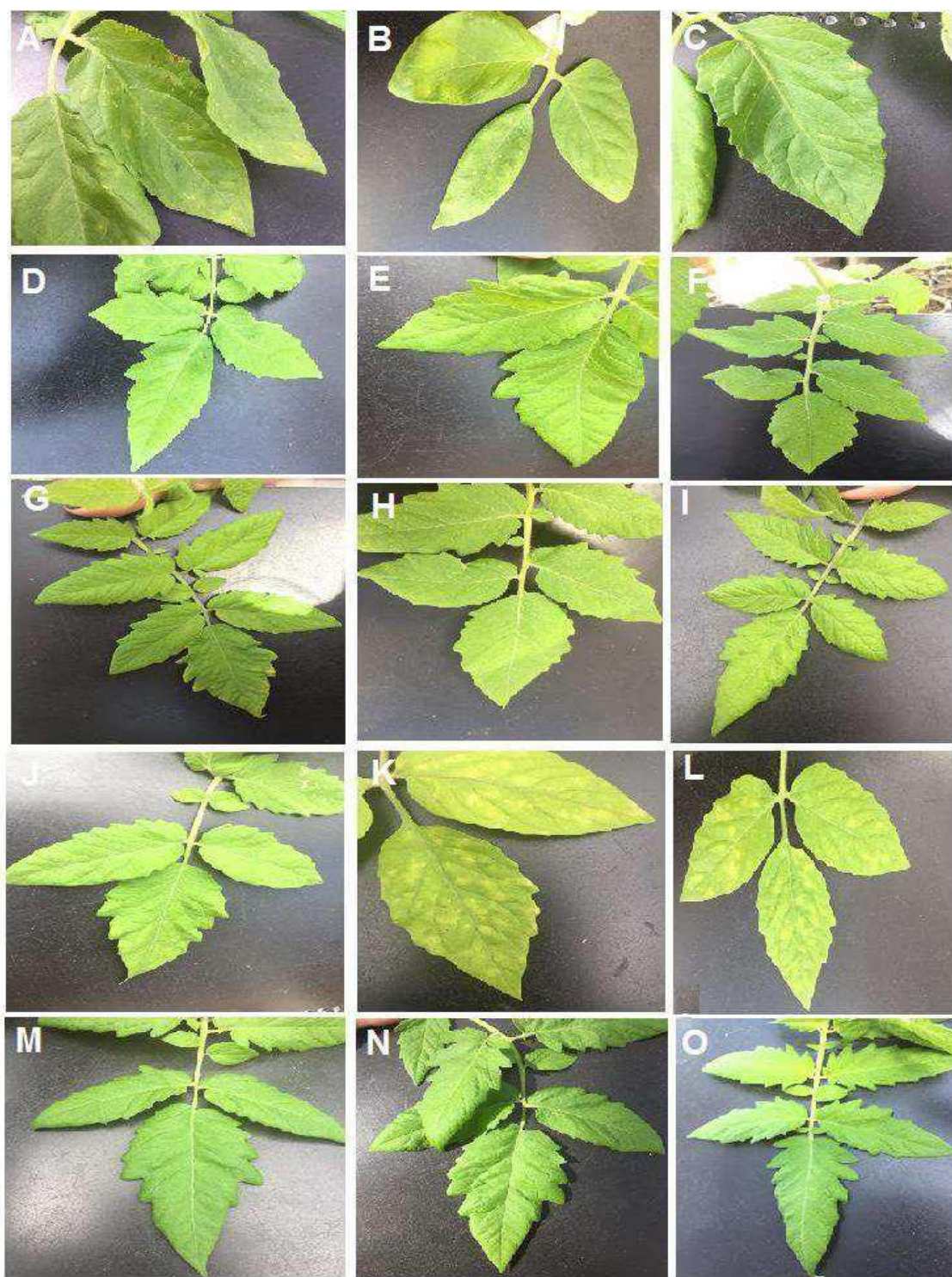


Figura 17. Plantas de tomate após 20 dias de inoculação com *X. euvesicatoria*. Controle (A, B, C); pulverização de ϵ -PL na CIM 2 dias após inoculação (D, E, F); pulverização de ϵ -PL 2xCIM 2 dias após a inoculação (G, H, I); pulverização de ϵ -PL na CIM 2 dias antes da inoculação (J, K, L); pulverização de ϵ -PL 2xCIM, 2 dias antes da inoculação (M, N, O).

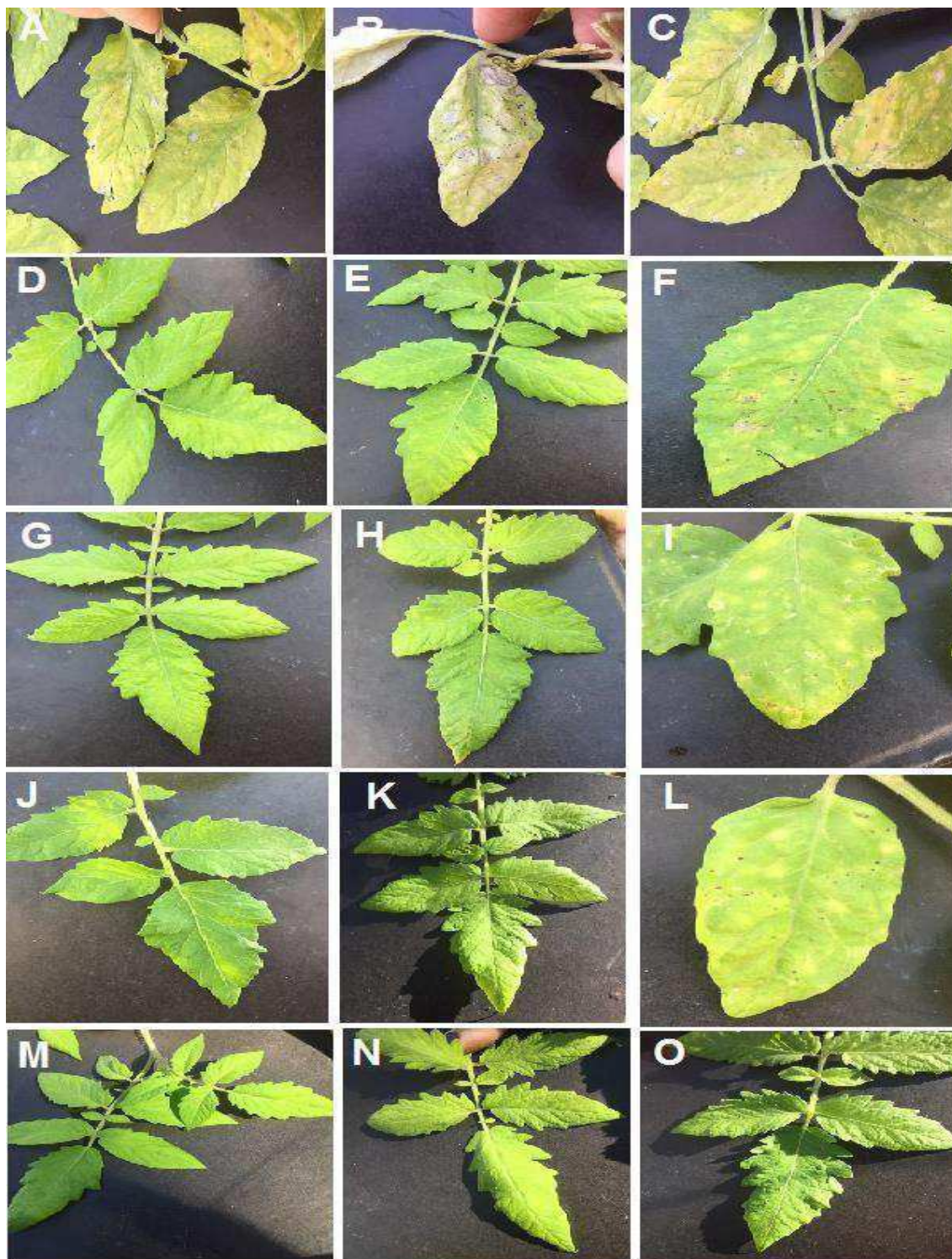


Figura 18. Plantas de tomate após 30 dias de inoculação com *X. euvesicatoria*. Controle (A, B, C); pulverização de ϵ -PL na CIM 2 dias após inoculação (D, E, F); pulverização de ϵ -PL 2xCIM 2 dias após a inoculação (G, H, I); pulverização de ϵ -PL na CIM 2 dias antes da inoculação (J, K, L); pulverização de ϵ -PL 2xCIM, 2 dias antes da inoculação (M, N, O).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, a ação antimicrobiana *in vitro* da Epsilon-Poli-L-lisina contra as fitobactérias foi significativa. A inibição do crescimento microbiano ocorreu em baixas concentrações, e houve drástica redução na quantidade de células viáveis após o tratamento com o peptídeo, confirmando sua atividade bactericida. As alterações celulares confirmam que o tratamento com a Epsilon-Poli-L-lisina pode levar à morte celular. Sabe-se que o peptídeo em estudo é biodegradável, não tóxico para o ambiente nem para os seres vivos, estável em altas temperaturas, e possui atividade antimicrobiana contra amplo espectro de micro-organismos. Após o tratamento das plantas de tomate com o peptídeo, notou-se que plantas tratadas preventivamente com 200% da CIM não apresentaram sintomas. Portanto, a Epsilon-Poli-L-lisina apresenta-se como uma alternativa promissora para uso prático no controle de fitobacterioses.

Referências

- ALMAYTAAH, A. et al. **Peptide consensus sequence determination for the enhancement of the antimicrobial activity and selectivity of antimicrobial peptides**. *Infection and Drug Resistance*, v.10, p.1-17, 2017. <https://doi.org/10.2147/IDR.S118877>
- AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A. **A epidemiologia do Cancro Cítrico**. *Summa Phytopathologica*, v.27, p. 151-156, 2001.
- ANDRADE, G.M.; SARTORETTO, L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. **Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp.**, *Fitopatologia Brasileira*, v.28, p.465-473, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000500001>
- BAHAR, A.A.; REN, D. **Antimicrobial Peptides**. *Pharmaceuticals*, v.6, p.1543-1575, 2013. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- BANG, C. et al. **Effects of Antimicrobial Peptides on Methanogenic Archaea**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.56, p.4123-4130, 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.00661-12>
- BANSAL, K.; MIDHA, S.; KUMAR, S.; PATIL, P.B. **Ecological and evolutionary insights into pathovar diversity of *Xanthomonas citri***. *Applied and Environmental Microbiology*, v.83, 36p, 2017. <https://doi.org/10.1128/AEM.02993-16>

BARBOSA, V. **The processing tomato growing system under tropical and subtropical conditions – the Brazilian experience.** IN: International Conference on the Processing Tomato, ed.1, 1996, Recife. Proceedings, Recife: IPA/ASHS, 1997. P.94-97.

BERNEY, M. et al. **Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry.** Applied and Environmental Microbiology, v.73, p.3283-3290, 2007. <https://doi.org/10.1128/AEM.02750-06>

BRINGEL, J.M.M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H. **Colonização radicular de plantas cultivadas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3.** Scientia Agricola, v.58, p.497-500, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000300010>

BROGDEN, K.A. **Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?** Nature Review Microbiololy, v.3, p.238-250, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

BRUNINGS, A.M., GABRIEL, D.W. ***Xanthomonas citri*: breaking the surface.** Molecular Plant Pathology, v. 4, p.141– 157, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00163.x>

CHAN, J.; GOODWIN, P. **The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*.** Biotechnology Advances, v. 17, p. 489-508, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00025-7)

CHE, Y.Z. et al. **A novel antimicrobial protein for plant protection consisting of a *Xanthomonas oryzae* harpin and active domains of cecropin A and melittin.** Microbial Biotechnology, v.4, p.777-793, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00281.x>

CHHEDA, A.H.; VERNEKAR, M.R. **A natural preservative ϵ -Poly-L-lysine: fermentative production and applications in food industry.** International Food Research Journal, v.22, p.23-30, 2015.

COLVILLE, K. et al. **Effects of Poly (L-lysine) Substrates on Attached *Escherichia coli* Bacteria.** Langmuir Article, v.26, p.2639-2644, 2010. <https://doi.org/10.1021/la902826n>

CRUZ, J.C.C. 2009. **Diversidade genômica, patogenicidade e sensibilidade a compostos bioativos em *Xanthomonas campestris*.** Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal. 78p.

DE CLEENE, M.; DE LEY, J. **The host range of crown gall.** Botanical Review, v.42, p.389-464, 1976. <https://doi.org/10.1007/BF02860827>

DELCARLO, M., LOESER, R.F. **Chondrocyte cell death mediated by reactive oxygen species-dependent activation of PKC- β 1.** American Journal of Physiology- Cell Physiology, v.290, p. 802–811, 2006. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00214.2005>

DOCENA, C. 2006. **Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-Componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.181p.

EL-SERSY, N., et al. **Antibacterial and anticancer activity of ϵ -poly-L-lysine (ϵ - PL) produced by a marine *Bacillus subtilis* sp.** Journal of Basic Microbiology, v.52, p. 513-522, 2012. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100290>

FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E. **Records of citrus Canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States.** Phytopathology, p. 820-824, 1933.

FERRAREZI, J.H. et al. **Extratos de fungos da Antártica: Avaliação da atividade contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. IN: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA), 1., 2016, Jaboticabal. Ciência e Tecnologia, Jaboticabal, v.8, 2016.

FJELL, C.D. et al. **Designing antimicrobial peptides: form follows function.** Nature Reviews Drug Discovery, v.11, p.37-51, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Secretaria da Agricultura de São Paulo muda lei de controle de cancro cítrico.** In: Comunicação. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias>>. Acessado em: 25/05/2017.

GABAY, J.E. **Ubiquitous natural antibiotics.** Science, v. 264, p. 373-374, 1994. <https://doi.org/10.1126/science.8153623>

GALLO, R.L. et al. **Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides.** Molecular Mechanisms In Allergy and Clinical Immunology, p.823-831, 2002. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.129801>

GAMA, M.A.S. et al. **Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais.** 1.ed. Recife: Universitária da UFRPE, 2016.

GARRITY, G. et al. **The Bacteria: Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria.** The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea, v.7, 2007.

GEORNARAS, I. et al. **Antimicrobial activity of epsilon-polylysine against *Escherichia coli* O157:H7 *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts.** Food microbial, v.72, p.330-334, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00510.x>

GITAITIS, R.; McCARTER, S.; JONES, J.B. **Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida.** Plant Disease, v.76, p.651-656, 1992. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0651>

GOODE, M.J., SASSER, M. **Prevention - the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato.** Plant Disease, v.64, p.831-834, 1980.
<https://doi.org/10.1094/PD-64-831>

GUELL, I. et al. **Design, synthesis and biological evaluation of cyclic peptidotriazoles derived from BPC194 as novel agents for plant protection.** Biopolymers: Peptide Science, p.1-30, 2016.
<https://doi.org/10.1002/bip.23012>

GUO, R. et al. **A rapid and low-cost estimation of bacteria counts in solution using fluorescence spectroscopy.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.409, p. 3959-3967, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0347-1>

HANCOCK, R.E., SAHL, H.G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies.** Nature Biotechnology, v.24, p.1551–1557, 2006. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>

HAYWARD, A.C. **Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*.** Annual Review of Phytopathology, v. 29, p. 65-87, 1991. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>

HIRAKI, J. **ϵ -Polylysine, its development and utilization.** Fine Chemicals, v.29, p. 18–25, 2001.

HIRAKI, J. et al. **Use of ADME studies to confirm the safety of epsilon- polylysine as a preservative in food.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v.37, p.328-340, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(03)00029-1)

HIROHARA, H. et al. **Biosynthesis of poly(ϵ -L-lysine)s in two newly isolated Strains of *Streptomyces* sp.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 73, p.321- 331, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0479-2>

HOU, S. et al. **Effects of Trp- and Arg-Containing Antimicrobial-Peptide Structure on Inhibition of Escherichia coli Planktonic Growth and Biofilm Formation.** Applied and environmental microbiology, v. 76, p. 1967-1974, 2010.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02321-09>

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.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0183>

HYLDGAARD, M. et al. **The Antimicrobial Mechanism of Action of Epsilon-Poly-L-Lysine.** Applied and Environmental Microbiology, v.80, p. 7758–7770, 2014.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02204-14>

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. **Peptide antimicrobial agents.** Clinical Microbiology Reviews, v.19, p. 491–511, 2006.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>

- JONES, J.B., STALL, R.E., BOUZAR, H. **Diversity among xanthomonads Pathogenic on pepper and tomato.** Annual Review of Phytopathology, v.36, p. 41–58, 1998. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.41>
- JONES, J.B. et al. **Reclassification of *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and Pepper.** Systematic and Applied Microbiology, v.27, p.755-762, 2004. <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>
- KADO, C. I. **Plant bacteriology.** St. Paul: Amer Phytopathological Society, 2010.
- KELMAN, A. **The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography.** 1.ed. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station, 1953.
- KEYMANESH, K.; SOLTANI, S.; SARDARI, S. **Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.25, p.933-944, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9984-7>
- KOEBNIK, R.; LOCHER, K.P.; VAN GELDER, P. **Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.** Molecular Microbiology, v.37, n.2, p.239-253, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x>
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. **Doenças do tomateiro.** In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia, v.2; p.690-719, 1997.
- LACERDA, L.A. et al. **Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Plasmid, v. 90, p. 44-52, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.005>
- LACROIX, B.; CITOVSKY, C. **Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes.** mBIO, v.7, 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00863-16>
- LIPPINCOTT, J.A.; LIPPINCOTT, B.B.; STARR, M.P. **The genus *Agrobacterium*.** In: STARR, M.P., STOLP, H., TRÜPER, H.G., BALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G. (Eds.) The prokaryotes: a handbook on habitats isolation, and identification of bacteria: Berlin, Springer-Verlag. 1981. p.842-855. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_68
- LOEFFLER, J.M.; NELSON, D.; FISCHETTI, V.A. **Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase.** Science, v. 294, p. 2170–2172, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1066869>
- LOPES, C.A. **Murchadeira da batata.** Itapetininga: ABBA/ Brasília: Embrapa Hortaliças. 2005. 68p.
- LOPES, C.A., QUEZADO-DUVAL, A.M. **Doenças bacterianas.** In: Lopes, C.A., Ávila, A.C. Doenças do Tomateiro. Brasília: EMBRAPA-CNPq, p.62-64, 2005.

LOPES, C.A.; QUEZADO- DUVAL, A.M. **Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças**. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C.A.; PICANÇO, M.C.; COSTA, H. (Org.). Manejo integrado de doenças e pragas - hortaliças. Visconde do Rio Branco: Surpema Gráfica e Editora, 2007.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 70p., 1997.

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. et al. **Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: Uma Atualização**. Summa Phytopatologica, v.34, 188p, 2008.

MASSARI, C. A.; BELASQUE-JÚNIOR, J. **A campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo - situação atual e contaminação em viveiros**. Laranja, Cordeirópolis, v. 27, n. 1, p. 41-55, 2006.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado: 29 de Maio 2017.

MATSUZAKI, K. et al. **An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation**. Biochemistry, v.35, p.11361-11368, 1996. <https://doi.org/10.1021/bi960016v>

MATSUZAKI, K. et al. **Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2**. Biochemistry, v.37, p.11856-11863, 1998. <https://doi.org/10.1021/bi980539y>

MEYER, D.F.; BOGDANOVA, A.J. **Genomics-driven advances in Xanthomonas biology**. Plant Pathogenic Bacteria – Genomics and Molecular Biology. Norfolk: Academic Press, 2009.

MELLO, S. C. M; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. **Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.22, p.447-448, 1997.

MORAIS, T.P. et al. **Occurrence and diversity of *Ralstonia solanacearum* populations in Brazil**. Bioscience Journal, v. 31, p. 1722 – 1737, 2015. <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n6a2015-28431>

MICHEREFF, S.J. Bactérias como agentes de doenças de plantas. Recife-PE: UFRPE, 2016.

MOREIRA, L. M. et al. **Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria**. Annuals Reviews Phytopathology, v. 42, p. 163-184, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140310>

MUÑOZ, A.; LÓPEZ-GARCÍA, B.; MARCOS, J.F. **Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.354, p.172-177, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.173>

NAJJAR, M.B., KASHTANOV, D., CHIKINDAS, M. **ϵ -Poly-l-lysine and nisin A act synergistically against Gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes***. Letter in Applied Microbiology, v. 45, p.13–18, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02157.x>

NESTER, E.W. ***Agrobacterium*: nature's genetic engineer**. Frontiers in plant science, v.5, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>

NISHIKAWA, M., OGAWA, K. **Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method**. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, p.3575–3581, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3575-3581.2002>

OUYANG, J. et al. **Production of ϵ -poly- L-lysine by newly isolated *Kitasatospora* sp.PL6-3**. Biotechnology Journal, v.1, p.1459-1463, 2006. <https://doi.org/10.1002/biot.200600079>

PEETERS, N. et al. ***Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant Pathogen in the post-genomic era**. Molecular Plant Pathology, v. 14, p.651-662, 2013. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>

PONTES, N.C. 2012. **Mancha-bacteriana em tomate industrial: métodos de inoculação, quantificação da doença e otimização do controle com acibenzolar-S-metil**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 86p.

POWERS, J.P.; HANCOCK, R.E. **The relationship between peptide structure and antibacterial activity**. *Peptides*, v.4, p. 1681–1691, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>

QUEZADO-DUVAL, A.M., LOPES, C.A. **Mancha-bacteriana: Uma Atualização Para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria**. Brasília: Embrapa Hortaliças, (Circular Técnica 84), 28p, 2010.

REMENANT, B et al. **Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence**. BioMed Central Genomics, v. 10, p. 1-16, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-379>

RODRIGUES NETO, J. Doenças bacterianas do tomateiro. In: SINIGAGLIA, C.; RODRIGUES NETO, J., COLLARICIO, A.; VICENTE, M.; GROppo, G.; GRAVENA, S.; LEITE, D. **Manejo integrado de pragas e doenças do tomateiro**. São Paulo: Manual Técnico-série especial, v.6, 2000. p.42-52.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005.

SCHAAD, N. W. et al. **Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus**. Systematic and Applied Microbiology, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.08.001>

SHAI, Y. **Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid**

bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1462, p.55- 70, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X)

SHIMA, S. et al. **Antimicrobial action of ϵ -Poly-L-Lysine.** *The Journal of Antibiotics*, v.37, p.1449-1455, 1984. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1449>

SHUKLA, S.C., MISHRA, A. **ϵ -PolyLysine production from sugarcane molasses by a new isolates of *Bacillus* sp. and optimization of fermentation condition.** *Annals of Microbiology*, v. 63,p. 1513-1523, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0615-z>

SMITH, E.F. **A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.).** United States Department of Agriculture: Division of Vegetable Physiology and Pathology, Bulletin, v.12, p. 1-28, 1896.

SMITH, E.F.; TOWNSEND, C.O. **A plant-tumor of bacterial origin.** *Science*, v.25, p.671-673, 1907. <https://doi.org/10.1126/science.25.643.671>

SIEMENS, J.; SCHIEDER, O. **Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of art.** *Plant Tissue Culture Biotechnology*, v. 2, p. 66-75, 1996.

STOCKS, S. M. **Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight.** *Cytometry*, v.61, p.189-195, 2004. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20069>

SUBRAMONI, S. et al. ***Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules.** *Frontiers in Plant Science*, v.5, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. **Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle.** *Horticultura Brasileira*, v.15, p. 170-177, 1997.

TAKEHARA, et al. **High-yield production of short chain length poly (ϵ -L-lysine) consisting of 5–20 residues by *Streptomyces aureofaciens*, and its antimicrobial activity.** *Biotechnology Letters*, v.32, p.1299-1303, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0294-9>

VIDHYASEKARAN, P. **Bacterial disease resistance in plants.** *Molecular biology and biotechnological applications.* The Haworth Press, Binghamton, NY, 452 p., 2002.

ZASLOFF, M. **Antimicrobial peptides of multicellular organisms.** *Nature*, v. 415, p.389–395, 2002. <https://doi.org/10.1038/415389a>

ZEITLER, B. et al. **De novo design of antimicrobial peptides for plant protection.** *PLoS ONE*, v.8, e71687, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071687>

ZHAO, R. et al. **Biodegradable cationic ϵ -poly-L-lysine-conjugated polymeric nanoparticles as a new effective antibacterial agent.** Science Bulletin, v.60, p.216-226, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11434-014-0704-9>

WANG, G., et al. **Effect of ferrous ion on ϵ -poly-L-lysine biosynthesis by *Streptomyces diastatochromogenes* CGMCC3145.** Current Microbiology, v.62, p. 1062- 1067, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9828-6>

YANG, L. et al. **New Insights into the Antibacterial Activity of Hydroxycoumarins against *Ralstonia solanacearum*.** Molecules, v. 21, p. 468- 480, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21040468>

YE, R. et al. **Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -Poly-L-lysine.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 439, p. 148-153,2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.001>

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. **Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.** Pharmacological Reviews, v.55, p.27-55, 2003. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>

YOSHIDA, T., NAGASAWA, T. **ϵ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 62, p. 21-26, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1312-9>

YULIAR; NION, Y.A.; TOYOTA, K. **Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*.** Microbes and Environments, v.30, p.1-11,2015. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144>