

GILMAR FRANZENER

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA EM PEPINO E
FEIJÃO A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DE EUCALIPTO CITRIODORA**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JUNHO 2011**

GILMAR FRANZENER

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA EM PEPINO E
FEIJÃO A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DE EUCALIPTO CITRIODORA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JUNHO 2011**

GILMAR FRANZENER

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA EM PEPINO E
FEIJÃO A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DE EUCALIPTO CITRIODORA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em: 20 de junho de 2011

Prof.^a. Dr.^a. Cacilda Duarte Rios Faria

Prof. Dr. Odair José Kuhn

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Prof.^a. Dr.^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, Uno e Trino, Onipotente.

À professora Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, pela orientação, amizade, compreensão e ensinamentos.

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin, pela co-orientação, amizade, apoio e sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Braúlio Franzener e Inês Franzener, irmão Pe. Luiz Carlos, irmã Marisa, cunhado José Osni e sobrinho Gustavo.

Aos amigos dos Laboratórios de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá e da Universidade Estadual do Oeste do Paraná muito obrigado pelo companheirismo e auxílio nos trabalhos.

À Gabriela por todo apoio, carinho, incentivo e auxílio nos trabalhos.

À Universidade Estadual de Maringá, através do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGA) pela oportunidade concedida à realização do curso de Doutorado em Agronomia.

À Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro na execução do projeto.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela liberação para estudo e oportunidade de realização de experimentos.

À Universidade Federal da Fronteira Sul, alunos e colegas professores, pelo apoio e incentivo na etapa final de realização desse trabalho.

Agradeço a todos que se fizeram presentes em algum momento. Muito obrigado.

BIOGRAFIA

GILMAR FRANZENER, filho de Bráulio Franzener e Inêz Krul Franzener, nasceu em Marechal Cândido Rondon em 28 de abril de 1979. É engenheiro agrônomo, formado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste. Em 2005 concluiu o Mestrado em Agronomia também pela Unioeste. Em 2007 concluiu especialização em Planejamento para o Desenvolvimento Sustentável pela Unioeste. Em 2008 iniciou o Doutorado em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, na área de concentração de Proteção de Plantas.

ÍNDICE

LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Controle alternativo de doenças em plantas.....	3
2.2 Indução de resistência em plantas.....	4
2.3 Mecanismos de defesa das plantas.....	6
2.3.1 Fitoalexinas.....	6
2.3.2 Enzimas relacionadas à defesa das plantas.....	7
2.3.2.1 Peroxidases.....	7
2.3.2.2 Polifenoloxidasas.....	9
2.3.2.3 Fenilalanina-amônia-liase (FAL).....	10
2.3.2.4 Quitinases e β -1,3-glucanases.....	11
2.4 Elicitores.....	12
2.5 Plantas medicinais.....	13
2.6 Patossistemas estudados.....	17
2.6.1 Antracnose do pepino causada por <i>Colletotrichum lagenarium</i>	17
2.6.2 Crestamento bacteriano em feijoeiro causado por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Planta medicinal e obtenção do extrato aquoso.....	21
3.2 Isolamento, manutenção e preparo do inóculo dos fitopatógenos.....	21
3.3 Curva de autoclavagem.....	22
3.4 Bioensaios em plantas de pepino e feijão.....	23
3.5 Bioensaios em plântulas de pepino e feijão.....	24

3.6 Avaliação da atividade protetora e indutora de enzimas de defesa nas culturas de pepino e feijão tratadas com extrato aquoso.....	25
3.6.1 Avaliação do efeito local e sistêmico.....	25
3.6.2 Avaliação da dose de resposta.....	26
3.6.3 Efeito do número de aplicações.....	26
3.7 Bioensaio de indução de faseolina em feijoeiro.....	26
3.8 Análises bioquímicas para atividades enzimáticas.....	27
3.8.1 Obtenção dos extratos enzimáticos.....	27
3.8.2 Proteínas totais.....	27
3.8.3 Açúcares redutores.....	28
3.8.4 Peroxidases.....	28
3.8.5 Polifenoloxidasas.....	28
3.8.6 Fenilalanina amônia-liase (FAL).....	29
3.8.7 β -1,3-glucanases.....	29
3.8.9 Quitinases.....	29
3.9 Precipitação fracionada do extrato aquoso por sulfato de amônio.....	30
3.10 Separação dos componentes da preparação elicitora bruta através de cromatografia de troca iônica (CTI).....	30
3.10.1 Cromatografia de troca iônica utilizando tampão Tris-HCl.....	31
3.10.2 Cromatografia de troca iônica utilizando tampão bicarbonato de amônio.....	31
3.11 Cromatografia de filtração em gel (CFG).....	33
3.12 Caracterização parcial das frações com atividade biológica.....	33
3.13 Análise dos dados.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Curva de autoclavagem do extrato aquoso.....	37
4.2 Efeito protetor e indutora de enzimas de defesa em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro pelo extrato aquoso de <i>C. citriodora</i>	40
4.2.1 Atividade local e sistêmica em plantas de pepino e feijão.....	49
4.2.2 Avaliação da dose de resposta em plântulas de pepino e feijão..	54
4.2.3 Efeito do número de aplicações do extrato aquoso em plântulas	

de pepino e feijão.....	55
4.3 Precipitação fracionada do extrato aquoso por sulfato de amônio.....	58
4.4 Cromatografia de troca iônica com tampão Tris-HCl.....	59
4.5 Cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio.....	61
4.6 Cromatografia de filtração em gel (CFG).....	66
4.7 Caracterização parcial das frações ativas.....	72
5. DISCUSSÃO.....	78
5.1 Efeito da curva de autoclavagem na atividade do extrato e conteúdo de proteínas e açúcares redutores.....	78
5.2 Atividade protetora e indutora de enzimas de defesa pelo EA em pepino e feijão.....	79
5.3 Atividade local e sistêmica do extrato aquoso em pepino e feijão.....	83
5.4 Dose de resposta do extrato aquoso em pepino e feijão.....	84
5.5 Efeito do número de aplicações na indução de resistência em pepino e feijão pelo extrato aquoso.....	85
5.6 Atividade das frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio	86
5.7 Atividade das frações obtidas por cromatografia de troca iônica.....	86
5.8 Atividade das frações obtidas por cromatografia de filtração em gel..	89
5.9 Caracterização das frações de maior atividade.....	91
6. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atividades de peroxidases, β -1,3-glucanases e severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio.....	58
Quadro 2. Atividades de peroxidases, produção de faseolina e severidade do crestamento bacteriano em plântulas de feijoeiro tratadas com frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio.....	59
Quadro 3. Atividades de peroxidases, β -1,3 glucanases e severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com os picos protéicos provenientes da cromatografia de troca iônica.....	65
Quadro 4. Atividades de peroxidases, faseolina e severidade do crestamento bacteriano em folhas de feijoeiro tratadas com os picos protéicos provenientes da cromatografia de troca iônica.....	66
Quadro 5. Massa molecular relativa (Mm) e atividades de peroxidases, β -1,3 glucanases e severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com os picos protéicos provenientes da cromatografia de filtração em gel.....	70
Quadro 6. Massa molecular relativa (Mm) e atividades de peroxidases, faseolina e severidade de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em folhas de feijoeiro tratadas com os picos protéicos provenientes da cromatografia de filtração em gel.....	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Folhas de *Corymbia citriodora* (A) e detalhe de ramo, pecíolo e folhas jovens apresentando típica setose (B)..... 15
- Figura 2.** Sintomas típicos de *Colletotrichum lagenarium* e folha de pepino.... 18
- Figura 3.** Sintomas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas (A) e sementes (B) (sementes sadias (I) e sementes sintomáticas (II)) de feijão..... 20
- Figura 4.** Extratos aquosos de *Corymbia citriodora*. Extrato apenas filtrado em gaze e papel de filtro quantitativo (A). EA centrifugado a 20.000 g por 20 min e filtrado em membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro (B) (Millipore). EA autoclavado por 20 min a 120°C obtido de forma idêntica ao extrato B (C)..... 35
- Figura 5.** Conteúdo de açúcares redutores (A) e proteínas totais (B) no extrato aquoso de *C. citriodora* submetido à autoclavagem uma vez ou sequencial. Barras representam o erro padrão da média..... 36
- Figura 6.** Severidade de *Colletotrichum lagenarium* (A) e atividade de peroxidases (B) em cotilédones de pepino tratados com extrato aquoso (EA) de *Corymbia citriodora* submetido à autoclavagem uma vez ou sequencial. Barras representam o erro padrão da média..... 38
- Figura 7.** Severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (A) e atividade de peroxidases (B) em plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (EA) de *Corymbia citriodora* submetido a autoclavagem uma vez ou sequencial. Barras representam o erro padrão da média..... 39
- Figura 8.** Severidade da antracnose em cotilédones de pepino (A) e do crestamento bacteriano em plântulas de feijoeiro (B) tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 42
- Figura 9.** Atividade de peroxidases em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 43

Figura 10. Atividade de β -1,3-glucanases em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspense em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 44

Figura 11. Atividade de quitinases em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspense em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 45

Figura 12. Atividade de polifenoloxidasas em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspense em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 46

Figura 13. Atividade de fenilalanina amônia-liase em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspense em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 47

Figura 14. Acúmulo de faseolina em hipocótilos estiolados de feijoeiro tratados com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspense em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 48

Figura 15. Efeito da aplicação do extrato aquoso de <i>Corymbia citriodora</i> sobre a severidade da antracnose em plantas de pepino em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a inoculação com <i>Colletotrichum lagenarium</i> . Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média. **Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	50
Figura 16. Efeito da aplicação do extrato aquoso de <i>Corymbia citriodora</i> sobre a atividade de peroxidases em plantas de pepino em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a amostragem para atividade enzimática. Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média. **Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	51
Figura 17. Efeito da aplicação do extrato aquoso de <i>Corymbia citriodora</i> sobre a severidade do crestamento bacteriano em plantas de feijoeiro em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a inoculação com <i>Colletotrichum lagenarium</i> . Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média.....	52
Figura 18. Efeito da aplicação do extrato aquoso de <i>Corymbia citriodora</i> sobre a atividade de peroxidases em plantas de feijoeiro em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a amostragem para atividade enzimática. Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média. **Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	53
Figura 19. Severidade da antracnose (A) e atividade de peroxidases (B) em cotilédones de pepino tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Corymbia citriodora</i> . Barras representam o erro padrão da média...	54
Figura 20. Severidade do crestamento bacteriano (A) e atividade de peroxidases (B) em plântulas de feijoeiro tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>C. citriodora</i> . Barras representam o erro padrão da média.....	55
Figura 21. Severidade da antracnose e atividade de peroxidases em cotilédones de pepino tratados uma vez ou duas vezes (3 dias ou 3 e 6 dias antes da inoculação ou coleta de amostras, respectivamente) com extrato aquoso (20%) de <i>Corymbia citriodora</i> . Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L ⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	56

- Figura 22.** Severidade do crestamento bacteriano e atividade de peroxidases em plântulas de feijoeiro tratados uma vez ou duas vezes (3 dias ou 3 e 6 dias antes da inoculação ou coleta de amostras, respectivamente) com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 57
- Figura 23.** Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 à 1 M). Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (□) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl foram (-) determinadas indiretamente por condutividade. Números romanos de I a VI indicam os picos protéicos..... 60
- Figura 24.** Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído com NaCl no mesmo tampão, em procedimento “step wise”. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (□) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl foram (-) determinadas indiretamente por condutividade. Números romanos de I a VI indicam os picos protéicos..... 61
- Figura 25.** Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído com bicarbonato de amônio. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (□) pelo método de Lever (1972). Concentrações de bicarbonato de amônio (-) foram determinadas indiretamente por condutividade. Números romanos de I a VI indicam os picos protéicos..... 62
- Figura 26.** Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído no mesmo tampão, em procedimento “step wise”.. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (□) pelo método de Lever (1972). Concentrações de bicarbonato de amônio (-) foram determinadas indiretamente por condutividade. Números romanos de I a VI indicam os picos protéicos..... 63

- Figura 27.** Cromatografia de filtração em gel da fração I da cromatografia de troca iônica adsorvida em DEAE-Celulose e eluída com tampão bicarbonato de amônio. Frações coletadas de 1 mL em fluxo de 0,5 mL min⁻¹ eluídas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Seta indica o V0 (“void volume”). Conteúdo de proteínas monitorado pela absorbância a 280 nm. I: indica o pico protéico. Conteúdo de proteínas (●) e de açúcares redutores (○)..... 67
- Figura 28.** Cromatografia de filtração em gel da fração II da cromatografia de troca iônica adsorvida em DEAE-Celulose e eluída com tampão bicarbonato de amônio. Frações coletadas de 1 mL em fluxo de 0,5 mL min⁻¹ eluídas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Seta indica o V0 (“void volume”). Conteúdo de proteínas monitorado pela absorbância a 280 nm. Números romanos I e II indicam os picos protéicos. Conteúdo de proteínas (●) e de açúcares redutores (○)..... 68
- Figura 29.** Cromatografia de filtração em gel da fração IV da cromatografia de troca iônica adsorvida em DEAE-Celulose e eluída com tampão bicarbonato de amônio. Frações coletadas de 1 mL em fluxo de 0,5 mL min⁻¹ eluídas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Seta indica o V0 (“void volume”). Conteúdo de proteínas monitorado pela absorbância a 280 nm. Números romanos de I a IV indicam os picos protéicos..... 69
- Figura 30.** Severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 72
- Figura 31.** Atividade de peroxidases em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 73
- Figura 32.** Atividade de β-1,3-glucanases em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 74

Figura 33. Severidade do crestamento bacteriano em plântulas de feijoeiro tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 75

Figura 34. Atividade de peroxidases em plântulas de feijoeiro tratadas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 76

Figura 35. Acúmulo de faseolina em plântulas de feijoeiro tratadas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 76

RESUMO

FRANZENER, Gilmar. Universidade Estadual de Maringá, junho 2011. Caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso de eucalipto citriodora. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada.

Compostos secundários das plantas medicinais podem ativar mecanismos de defesa em plantas contra patógenos. O extrato aquoso (EA) de *Corymbia citriodora* tem manifestado essa atividade, mas são escassas informações dos mecanismos de ação e de características de frações com atividade. Assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do EA sobre mecanismos de defesa em pepino e feijão, e na proteção contra *Colletotrichum lagenarium* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, respectivamente, além de obter e caracterizar frações com atividade biológica. Para tanto, o EA foi avaliado quanto a capacidade de proteção e indução de peroxidases, polifenoloxidasas, quitinases e β -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase nas culturas de feijão e pepino, e faseolina em feijão. Água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) foram utilizados como testemunhas. Precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica (CTI) e filtração em gel foram realizadas para separar frações com poder elicitor. Frações com atividades biológicas foram submetidas à autoclavagem ou ao tratamento com proteínase. Em pepino, o EA reduziu a severidade de *C. lagenarium* e induziu peroxidases e β -1,3-glucanases. Em feijão, o EA induziu peroxidases e faseolina. Três frações com atividades foram obtidas por CTI. A fração I, contendo carboidratos e proteína, teve atividade reduzida pela ação de proteínase, sugerindo possível natureza glicoproteica. O tratamento térmico não reduziu a atividade das frações indicando presença de compostos termo-resistentes. A obtenção de diferentes frações com efeito inferior ao EA sugere sinergismo entre compostos na indução de resistência pelo EA de *C. citriodora*.

Palavras-chave adicionais: Controle alternativo, enzimas relacionadas a defesa, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Corymbia citriodora*.

ABSTRACT

FRANZENER, Gilmar. Universidade Estadual de Maringá, June 2011. Partial characterization of resistance inducers in cucumber and bean by eucalyptus citriodora aqueous extract. Adviser: Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada.

Secondary compounds of medicinal plants can activate defense mechanisms against plants pathogens. The aqueous extract (AE) of *Corymbia citriodora* have shown activity, but there is little information about the action mechanism and the characteristic of the fractions with activity. Thus, the aim of this work was evaluate the effect of AE on defense mechanisms in bean and cucumber, and the protection against *Colletotrichum lagenarium* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, respectively, and to characterize the fractions with biological activity. For this, the AE was evaluated with the ability respect to the abilitis of induction of peroxidase, β -1.3 glucanase, phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and chitinase in bean and cucumber, and bean phaseolin. Distilled water and acibenzolar-S-methyl (50 mg a. i. L⁻¹) were used as controls. Precipitation with ammonium sulfate and gel filtration and ion change chromatography (ICC) were conducted to separate elicitors fractions. Fractions with activity were evaluated to autoclaving or treatment with proteínase. In cucumber, AE reduced the severity of *C. lagenarium* and induced peroxidase and β -1.3-glucanases. In the bean, AE induced phaseolin and peroxidases. Three fractions with activity were obtained by ICC. Fraction I containing carbohydrates and protein activity was reduced by the action of proteínase, suggesting a glycoprotein nature. The heat treatment did not reduce the activity of the fractions indicating the presence of heat-resistant compounds. The achievement of different fractions with effect below of the AE, suggests the synergistic activity between compounds in the resistance induction by of *C. citriodora* AE.

Additional keywords: Alternative control, Defense-related enzymes, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Corymbia citriodora*.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a intervenção para o controle de doenças de plantas é largamente realizada através de agrotóxicos. O uso racional desses produtos pode ter, a curto prazo, um efeito positivo para o produtor. No entanto, a longo prazo, além do surgimento de isolados dos patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos, devido à poluição causada pelos resíduos. Nesse contexto obtém expressão termos como “agricultura alternativa” que tem como um dos enfoques o controle alternativo de doenças.

O controle alternativo pode ser realizado pela indução dos mecanismos de defesa das plantas e pelo uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana. Moléculas de origem biótica ou abiótica capazes de ativar/induzir qualquer resposta de defesa nas plantas são chamadas de elicitores. Esses elicitores apresentam natureza diversa como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídios e ácidos graxos.

As plantas possuem diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos que podem contribuir para a resistência aos fitopatógenos. Entre estes mecanismos destacam-se as fitoalexinas e diferentes enzimas relacionadas à defesa da planta.

Compostos secundários de plantas medicinais podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno, pela ação antimicrobiana direta, ou ativando mecanismos de defesa de outras plantas que venham a ser tratadas com esses compostos.

Entre as plantas já estudadas que apresentam potencial em induzir resistência em plantas à patógenos encontra-se *Corymbia citriodora* (eucalipto). Embora seja conhecido o potencial do extrato bruto aquoso dessa planta em conferir proteção em outras plantas, ainda não foi realizada a separação e caracterização de frações com atividade biológica. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação do extrato de *C. citriodora* sobre a planta hospedeira.

Assim, a atividade protetora exercida pelo extrato aquoso de *C. citriodora* pode envolver a indução de enzimas de defesa como peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases. Além disso, o fracionamento pode permitir a obtenção de frações ativas que podem ser caracterizadas quanto a sua natureza protéica ou não, além de sua estabilidade frente ao tratamento térmico, que pode afetar ou não a atividade do extrato aquoso ou suas frações.

Diante disso, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito indutor de resistência do extrato aquoso de *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora) na proteção de pepino à *Colletotrichum lagenarium* e em feijoeiro à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, bem como obter e caracterizar frações biologicamente ativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle alternativo de doenças em plantas

A agricultura tem aumentado a sua potencialidade de produção, bem como o uso de produtos químicos, principalmente agrotóxicos. Um dos alvos desses produtos é o controle de doenças de plantas. O controle químico de doenças de plantas é talvez uma das medidas mais empregadas na agricultura (ZAMBOLIM, VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). Porém, o controle químico tradicional, além de elevar os custos de produção, depara-se com o surgimento de isolados de patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, o que tem conferido certa ineficiência no controle (PASCHOLATI, 1998; GHINI & KIMATI, 2000). O uso abusivo tem gerado problemas de contaminação e desequilíbrio ecológico (MOREIRA et al., 2008). Nesse contexto, tem-se incentivado a busca por produtos com modos alternativos de ação, que visam uma diminuição dos danos causados ao ambiente e aos seres vivos (BETTIOL, 2001; ALVES FILHO, 2002; BURG & MAYER, 2006). Além disso, a sustentabilidade, a segurança alimentar e a proteção do ambiente passam a ser uma necessidade e diretrizes para produção agrícola (SILVA et al., 2010). Assim, assume expressão o controle alternativo de doenças de plantas.

O controle alternativo de doenças, que não inclui o controle químico tradicional e o melhoramento genético, é realizado por meio do controle biológico e da indução de resistência em plantas (BETTIOL, 1991). Outras medidas alternativas de controle de doenças baseadas em métodos físicos, mecânicos ou culturais são por vezes referenciadas como métodos de controle alternativos (SILVA et al., 2010). O controle biológico pode ser definido como “o controle de um microrganismo através da ação direta de outro microrganismo”, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (COOK & BAKER, 1983; PASCHOLATI, 1998; BLUM; CARES; UESUGI, 2006; ROMEIRO, 2007). Já a resistência induzida envolve a ativação de mecanismos de resistência latentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo que essa resposta pode ser,

por exemplo, o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI, 1998).

Uma das linhas do controle alternativo que tem se mostrado muito promissora busca o emprego de metabólitos secundários de plantas (HELDT, 2005). Estes possuem atividade biológica direta sobre fitopatógenos ou indireta, ativando mecanismos de defesa, representando importante alternativa para o manejo de doenças em plantas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2003).

2.2 Indução de resistência em plantas

A indução de resistência em plantas tem sido definida como a ativação de mecanismos de defesa que se encontram latentes nas plantas pela infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos (como microrganismos viáveis ou inativados) (WEI; KLOEPPER; TUZUN, 1991; SILVA & RESENDE, 2001; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007) ou abióticos (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001; KUĆ, 2001; RESENDE et al., 2002, KUHN et al., 2006).

Moléculas de origem biótica ou abiótica capazes de induzir qualquer resposta de defesa nas plantas são chamadas de elicitores (SMITH, 1996; HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997), podendo, neste caso, atuarem como indutores de resistência (RESENDE et al., 2000).

A resistência induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento indutor) e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento desafiador). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias, são importantes no fenômeno da resistência induzida (PASCHOLATI & LEITE, 1995). A resistência induzida tem sido verificada em diversas plantas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas (SCHNEIDER et al., 1996).

A indução de resistência resulta na restrição do crescimento de fitopatógenos e conseqüentemente, na supressão ou diminuição dos sintomas de doenças, devido à ativação dos mecanismos de resistência das plantas, associada à expressão coordenada de um conjunto de genes de defesa (MÉTRAUX, 2001). Embora possa

apresentar um amplo espectro de ação, raramente a indução de resistência promove controle completo da doença (WALTERS, 2009).

A primeira etapa que compõe a resposta da planta a um indutor é o reconhecimento do indutor pela planta, após o contato deste, seja na parte aérea ou nas raízes. Este reconhecimento gera alterações que culminam com a geração de um sinal primário que pode ser translocado para outros locais diferentes do local de atuação. Este sinal leva a produção de substâncias como as proteínas relacionadas à patogênese, que podem atuar diretamente sobre o patógeno ou promover a ativação de mecanismos de defesa latentes (HAMMERSCHMIDT, 1999).

A indução de resistência não é específica, o que é refletido não somente pelos diferentes indutores passíveis de uso, mas também pelo amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta pode ser protegida (STICHER; MAUCHMANI; MÉTRAUX, 1997). Assim, esse aumento na resistência pode ser efetivo contra uma ampla faixa de patógenos e parasitas, incluindo fungos, bactérias, vírus, nematóides, plantas parasitas e até mesmo insetos herbívoros (KESSLER; BALDWIN, 2002).

Segundo Pascholati (1998), as plantas possuem diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos que podem contribuir para a sua resistência aos fitopatógenos. Esses mecanismos de resistência são determinados geneticamente e a sua efetividade é dependente da expressão dos mesmos, em local e em momentos adequados, magnitude adequada e sequência lógica que deve ocorrer após o contato do patógeno com o hospedeiro. Em princípio, todas as plantas são capazes de expressar genes de resistência, desde que recebam o estímulo adequado (TUZUN, 2001)

Há grande diversidade de agentes que podem induzir a produção de sinais na planta, desencadeando reações que culminarão em proteção contra uma ampla gama de fitopatógenos. Um exemplo de composto sintético é o éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico (acibenzolar-S-metil) (ASM) que é um análogo do ácido salicílico que representa um importante sinalizador envolvido na defesa das plantas. ASM tem sido amplamente estudado como agente indutor de resistência em plantas (TERRY & JOYCE, 2004).

2.3 Mecanismos de defesa das plantas

A resistência de um hospedeiro a um patógeno pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou em evitar a entrada e a subsequente atividade deste patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI & LEITE, 1995; AGRIOS, 2005). Os mecanismos de resistência das plantas são divididos em duas categorias: pré-formados (presentes nas plantas antes do contato com o patógeno) (LEITE & STANGARLIN, 2008; TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010) e pós-formados (produzidos ou ativados em resposta a presença do patógeno). Cada grupo de mecanismos compreende, por exemplo (PASCHOLATI & LEITE, 1995; LO & NICHOLSON, 2008):

a) Pré-formados (passivos ou constitutivos): estruturais (cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores) e bioquímicos (fenóis, alcalóides glicosídeos, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, fototoxinas). Compostos bioquímicos pré-formados também são chamados de fitoantecipinas.

b) Pós-formados (ativos ou induzíveis): geração de espécies reativas de oxigênio, reforço de paredes celulares (papilas, halos, lignificação), síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), e acúmulo de fitoalexinas.

Um grande número de enzimas está relacionado com a resistência induzida, tais como peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liase, lipoxigenases, β -1,3-glucanases e quitinases (HAMMERSCHIMIDT, 1999). Quitinases e β -1,3-glucanases são proteínas-RP que degradam a parede celular de patógenos liberando moléculas que agem como elicitores, nas etapas iniciais do processo de indução de resistência, de fitoalexinas e de compostos fenólicos (VAN LOON et al., 1994). Estas enzimas atuam na catalise de moléculas envolvidas na formação de lignina e outros fenóis que contribuem para o desencadeamento de barreiras de defesa, reforçando as estruturas das células das plantas (SILVA et al., 2004).

2.3.1 Fitoalexinas

Entre as respostas de defesa ativadas nas plantas encontra-se a síntese de fitoalexinas. As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular e produzidos pelas plantas em resposta aos estresses físicos,

químicos ou biológicos. São capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos (PURKAYASTHA, 1995). Segundo Snyder e Nicholson (1990), o controle da antracnose do sorgo, causada por *Colletotrichum sublineolum*, está relacionada ao efeito protetor das fitoalexinas e também em função da velocidade de resposta da planta no acúmulo desses compostos. Assim, o acúmulo rápido de fitoalexinas pela planta pode ser decisivo na defesa, mesmo em condições em que o patógeno entre em contato com a planta no momento do tratamento com o elicitor.

As fitoalexinas englobam diversas classes de produtos naturais, com mais de 300 delas caracterizadas, em diferentes classes de compostos químicos, como benzofurano, cumarina, dihidrofenantreno, diterpeno, flavonóide, furanoacetileno, isocumarina, isoflavonóide, poliacetileno, pterocarpano, sesquiterpeno, estilbeno e triterpeno (EBEL, 1986; SMITH, 1996). Atualmente, sabe-se que mais de 100 espécies de plantas, dentro de 21 famílias, são capazes de produzir algum tipo de fitoalexina. Entre as fitoalexinas mais estudadas na indução de resistência em plantas, estão deoxiantocianidinas em sorgo (LO et al., 1996) e a fitoalexina gliceolina em soja (BURDEN & BAILEY, 1975). Outra fitoalexina muito estudada e que exerce importante papel nas respostas de defesa da planta é a faseolina em feijoeiro (DIXON et al., 1983).

A faseolina é a fitoalexina mais importante na interação patógeno-planta no feijoeiro. Foi primeiramente detectada por Müller (1958). Desde então, estudos têm sido conduzidos comprovando sua ação no controle de patógenos, assim como a atividade antifúngica (BRAND et al., 2010). Durango et al. (2002) demonstraram ainda a ligação entre a produção de fitoalexinas em cultivares de feijoeiro e a resistência ou suscetibilidade aos patógenos.

A faseolina apresenta grande diversidade, apresentando mais de 40 variantes genéticas. Atualmente, têm também merecido estudos com objetivo de melhorar o valor nutricional do feijão comum (MONTROYA et al., 2010).

2.3.2 Enzimas relacionadas à defesa das plantas

2.3.2.1 Peroxidases

As peroxidases são enzimas presentes nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos, e são responsáveis por participarem de vários

processos fisiológicos de grande importância (CAVALCANTI et al., 2005). As peroxidases têm sido relacionadas com uma grande variedade de processos envolvidos na defesa celular das plantas, incluindo respostas de hipersensibilidade, lignificação, suberização e produção de fitoalexinas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992). Dentre eles, destaca-se a síntese de lignina, onde os alcoóis de fenilpropílicos são unidos em um polímero pela ação dessas enzimas, que cataliza a oxidação desses alcoóis, gerando radicais livres intermediários que se associam de forma não enzimática em uma disposição ao acaso para formar lignina (TAIZ & ZEIGER, 2009).

As peroxidases estão relacionadas com a ocorrência de infecção por patógenos desenvolvendo importante papel no reforço da parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos esterificados a ácidos ferúlicos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (FRY, 1986) bem como em respostas de sinalização e síntese de fitoalexinas (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999).

As peroxidases são glicoproteínas com massa molecular em torno de 40 kDa, bifuncionais, pois são capazes de gerar H_2O_2 que lhes servirá de substrato (CAVALCANTI et al., 2005). As peroxidases também são capazes de catalisar a incorporação de glicoproteínas à parede celular, a destruição peroxidativa do ácido indolacético e de outros reguladores de crescimento. Assim, em função de sua participação na síntese de lignina e oxidação de compostos fenólicos, as peroxidases podem contribuir com resistência das plantas aos fitopatógenos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Peroxidases possuem um grande número de isoformas. Uma isoforma isolada pode atuar sobre vários substratos *in vitro* e também mais de uma isoforma pode atuar sobre o mesmo substrato. Tem sido demonstrado que várias peroxidases são expressas constitutivamente em plantas (HIRAGA et al., 2001). Algumas peroxidases são induzidas durante o estresse causado por patógenos e essas peroxidases são consideradas proteínas - PR pertencentes a família PR-9 (VAN LOON & VON STRIEN, 1999; VIDHYASEKARAN, 2008).

As peroxidases têm papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas, além de estarem fortemente relacionadas com mecanismos de defesa em relação à patógenos e/ou aos vários estresses abióticos (LEE; KIM; LEE, 2001;

HSU & KAO, 2003). Na indução de resistência, as peroxidases são bastante estudadas devido a sua importância nos processos de defesa e, na maioria das vezes, o aumento na atividade está diretamente relacionada à redução da severidade da doença (KUHN, 2007). Muitos autores até consideram o acúmulo de peroxidases como um marcador bioquímico da resistência induzida em plantas de pepino (CONTI et al., 1994).

2.3.2.2 Polifenoloxidasas

Polifenoloxidasas (PFO) agrupam um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis transformando-os em quinonas constituindo uma atividade de difenolase. Porém, em algumas plantas, essas enzimas podem também catalisar a o-hidroxilação de monofenóis, constituindo atividade de monofenolase (MAYER & HAREL, 1979; VAUGHN & DUKE, 1984). Na literatura são também referidas como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (OKOT-KOTBER et al., 2002). Essas enzimas são amplamente distribuídas nas plantas, sendo encontradas também em várias espécies de bactérias, fungos e algas (MAYER & HAREL, 1979). As polifenoloxidasas (PFO) são enzimas localizadas nos plastídios, que utilizam o oxigênio molecular para a oxidação de mono e o-difenóis em o-diquinonas (VAUGHN; LAX; DUKE, 1988).

As polifenoloxidasas geralmente são abundantes em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência (AGRIOS, 2005).

Um importante papel das quinonas no processo de defesa celular é como fator antinutritivo na alimentação de insetos, onde taninos na forma fenólica são oxidados a quinonas apresentando alta reatividade com as proteínas da dieta do inseto, impedindo que esse possa digeri-las (TAIZ & ZEIGER, 2009). A ação contra fitopatógenos ocorre após a penetração, quando a PFO é liberada dos tilacóides, após a ruptura da célula pela penetração do patógeno, oxidando os compostos fenólicos que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas que apresentam ação antimicrobiana (LIU et al., 2005).

Peng et al. (2004) induziram pepino com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum* contra *Cladosporium cucumerinum*, reduzindo em até 70% a severidade da doença, dependendo da dose, correlacionando com o aumento da atividade de PFO após 72 horas. Para Liu et al. (2005), a indução de resistência com ASM também resultou em aumento na atividade de PFO em tratamento pós-colheita de frutos de pêssogo, promovendo redução da severidade de *Penicillium expansum* em 50%.

Vigo-Schultz (2008) também obteve aumento no conteúdo de polifenoloxidasas e peroxidases em plantas de feijão-vagem, cultivar Bragança, pelo tratamento com tintura etanólica de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp., *Hedera helix* e também pelo ativador de plantas acibenzolar-S-metil.

2.3.2.3 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima largamente estudada por fisiologistas devido a sua importância no metabolismo secundário das plantas (KUHNS, 2007). Esta enzima consiste em subunidades de 77 a 83 kDa (HEALTH, 2005). A FAL é uma enzima que está situada em um ponto de ramificação do metabolismo secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A FAL é responsável pela desaminação do aminoácido L-fenilalanina, transformando em ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser hidroxilado e/ou metilado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). O ácido trans-cinâmico é o primeiro produto formado na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores (RITTER & SCHULZ, 2004) e é considerado um inibidor da FAL (HELDT, 2005). Assim, entre as funções da FAL, destacam-se o suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina, síntese de substâncias que agem como protetores contra estresses abióticos como antioxidantes e compostos que absorvem radiação UV, ou proteção contra estresses bióticos como a ação de fitopatógenos, pela síntese de compostos como fitoantecipinas e a ação de insetos mastigadores pela síntese de compostos

fenólicos como fatores antinutritivos (DIXON & PAIVA, 1995). A indução de fitoalexinas após a infecção fúngica na planta geralmente envolve uma rápida indução de FAL (HELDT, 2005).

A FAL é encontrada principalmente em plantas superiores, mas também está presente em fungos (RÖSLER et al., 1997) e bactérias (XIANG & MOORE, 2005), mas não em animais (RÖSLER et al., 1997). Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares de feijoeiro com ácido salicílico (AS) e um isolado de *C. lindemuthianum* avirulento e observaram que o fungo e o AS induziram a atividade de FAL, mas a magnitude dessa atividade variou em função da cultivar utilizado. Peng et al. (2004) observaram aumento de sete vezes na atividade de FAL em pepino 48 horas após ser induzida com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum*. Gális; Smith e Jamenson (2004) induziram resistência em feijoeiro e observaram redução na multiplicação do vírus do mosaico branco do trevo (WCIMV), bem como aumento na expressão da FAL.

2.3.2.4 Quitinases e β -1,3-glucanases

As quitinases são enzimas com atividade hidrolítica sobre a quitina, componente da parede celular de fungos. No entanto algumas quitinases podem também hidrolisar outros polímeros relacionados a parede celular, como polissacarídeos contendo ácido N-acetilmurâmico, presentes em bactérias (KRAMER & MUTHUKRISHMAN, 1997).

As quitinases ocorrem normalmente nas plantas e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos. Além disso, a atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta à infecção e aos tratamentos hormonais e químicos. Assim como as β -1,3-glucanases, as quitinases são agrupadas entre as Proteínas-RP e exibem formas ácidas e básicas (PASCHOLATI & LEITE, 1995). O acúmulo de proteínas-RP em plantas após a infecção por patógenos é bem documentado (VAN LOON, 1997; VIDHIASEKARAN et al., 2001; MARTINS, 2008). Atualmente são classificadas em 17 famílias distintas, baseando-se na similaridade das sequências de aminoácidos, relação sorológica ou atividade enzimática ou biológica (GUZZO, 2004).

A presença de um patógeno induz a produção de várias quitinases, diferindo na localização, na atividade, propriedade da ligação com a quitina e mecanismo catalítico. O tipo de quitinase produzido durante a indução de resistência está intimamente relacionado ao estímulo indutor ao qual a planta é submetida (KASPRZEWSKA, 2003).

As β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana que, juntamente com a quitina, é o principal componentes que dão resistência a parede celular de fungos (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993).

Segundo Mauch e Staehelin (1989) na indução de resistência, quitinases e β -1,3-glucanases agem de forma conjunta. Uma pequena quantidade de β -1,3-glucanases é sintetizada e excretada para o espaço intercelular e, com o crescimento fúngico nesse espaço, esta enzima começa a degradar o tecido da parede celular do fungo e os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionam como exoelicitores, induzindo a síntese de grande quantidade de quitinases e β -1,3-glucanases que são acumuladas nos vacúolos. A partir do momento em que o fungo consegue penetrar na célula, os vacúolos são rompidos e ocorre a liberação de grande quantidade destas enzimas reprimindo a ação do patógeno.

2.4 Elicitores

Segundo Smith (1996), elicitores (ou eliciadores) são moléculas de origem biótica ou abiótica, capazes de estimular qualquer resposta de defesa nas plantas. Podem ser elicitores bióticos, que compreendem moléculas complexas, como carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, e elicitores abióticos, representados por acibenzolar-S-metil, luz ultravioleta, entre outros (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Esses elicitores agem como sinais químicos que são percebidos pelas plantas e induzem elementos envolvidos na resposta de defesa (CAVALCANTI; RESENDE; OLIVEIRA, 2007).

Os elicitores estimulam a resposta de defesa nas plantas e são reconhecidos por receptores, usualmente presentes na membrana plasmática, ativando uma cascata de transdução de sinais que levará à indução de uma rede de mecanismos de defesa (HAMMOND-KOSACK & PARKER, 2003). A existência destes sítios específicos de ligação de natureza protéica tem sido extensivamente demonstrada

para oligossacarídeos, glicopeptídeos e peptídeos (CHEONG & HAHN, 1991; HAHN, 1996). Assim, a parede celular vegetal, além de representar uma barreira física de defesa ao ataque de microrganismos, participa ativamente na interação molecular entre plantas e patógenos (VORWERK; SOMERVILLE; SOMERVILLE, 2004).

A variada natureza química dos elicitores demonstra que não há uma característica estrutural única que determine a atividade elicitora (SMITH, 1996), embora a estrutura da molécula seja importante no reconhecimento dos elicitores pela planta. Como exemplos dessa diversa natureza química de elicitores podem ser destacados oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos (STANGARLIN et al., 1999). Estes agem como sinais químicos que são percebidos pelas plantas e induzem elementos envolvidos na resposta de defesa. Esses elicitores podem ser classificados como exógenos, quando oriundos do patógeno invasor, ou endógenos, quando provenientes da própria planta, em decorrência do ataque do patógeno (SHIBUYA & MINAMI, 2001). Em alguns casos, a atividade elicitora pode ocorrer de maneira sinérgica, pela atuação de dois ou mais elicitores (DIXON & LAMB, 1990).

Segundo Braga (2008), são poucos os eliciadores de natureza protéica que não tem carboidrato como parte componente da molécula. Muitas glicoproteínas são potentes elicitoras da síntese de fitoalexinas, porém em poucos têm sido determinada qual a fração responsável pela atividade detectada.

2.5 Plantas medicinais

Uma planta é tida como medicinal quando apresenta em sua composição princípios ativos, cuja forma de preparo e administração é determinante pela ação terapêutica ou tóxica dessa planta (MUÑOZ, 2002).

As plantas medicinais podem apresentar em sua composição grande número de metabólitos secundários com atividade biológica (MAKKAR; SIDDHURAJU; BECKER, 2007; OLIVEIRA et al., 2010; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2003). Metabólitos secundários não são utilizados diretamente para nutrição e desenvolvimento das plantas, mas têm importante papel de defesa, além de auxiliar no aumento da capacidade de sobrevivência e adaptação das plantas ao

ambiente (SILVA et al., 2010). O extrato bruto aquoso ou o óleo essencial dessas plantas têm mostrado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta (FIORI et al., 2000; MOTOYAMA et al., 2003), inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos (FRANZENER et al., 2003; SOARES et al., 1998), quanto pela capacidade em induzir o acúmulo de fitoalexinas em sorgo e soja (BONALDO et al., 2004; FRANZENER et al., 2007), que indica, portanto, a presença de composto (s) ou molécula (s) com característica (s) de elicitor (es) (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008). Além disso, tem se demonstrado o potencial do extrato dessas plantas em ativar enzimas de defesa e conseqüente redução na severidade de doenças de plantas (KAGALE et al., 2004; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005; VIGO et al., 2009). Os princípios bioativos das plantas medicinais podem exercer simultaneamente efeitos diretos e indiretos (SILVA et al., 2010).

Entre os patossistemas que tem merecido atenção em estudos dessa natureza, destaca-se a antracnose causada por *C. lagenarium* em pepino. Alguns autores consideram o acúmulo de peroxidases em pepino como um marcador bioquímico da resistência induzida nessa cultura (CONTI et al., 1994). Visando à indução de resistência em pepino, Colpas (2002) verificou que o tratamento das primeiras folhas verdadeiras com extrato bruto de *Ocimum gratissimum*, quatro dias antes da inoculação com *C. lagenarium*, levou a uma diminuição do número de lesões formadas nas segundas folhas verdadeiras (não tratadas), 10 dias após a inoculação, indicando ação sistêmica do extrato.

Outra cultura em que tem sido verificado o potencial de controle alternativo de doenças pela ativação de mecanismos de defesa é o feijoeiro. Kuhn (2007) observou o acúmulo em plantas de feijoeiro de enzimas relacionadas à defesa da planta a partir do tratamento com indutor biótico (*Bacillus cereus*) e abiótico (acibenzolar-S-metil). Toillier et al. (2010) observaram potencial de controle do crescimento bacteriano comum causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus*. Faulin (2010) observou que plantas de feijoeiro tratadas com ASM tiveram aumentados seus teores de fenóis, proteínas totais e peroxidases, sugerindo que houve indução de resistência nas plantas em função da aplicação do ASM, visto que a severidade da doença

diminuiu nas mesmas. Estudos nesse sentido são muito importantes tendo em vista que as fitobactérias envolvem complexos mecanismos de patogenicidade e o controle geralmente é difícil (WULFF, 2008).

Vigo et al. (2009) avaliaram o efeito da aplicação da tintura das plantas medicinais *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp. e *Hedera helix* em feijão-vagem e observaram alterações na produção das enzimas de defesa e proteínas solúveis bem como menores valores da área abaixo da curva de progresso do cretamento bacteriano comum, indicando evidências de que essas tinturas apresentaram ação indutora de resistência do feijão-vagem.

O fenômeno de indução de resistência e ativação de enzimas de defesa em feijoeiro também tem sido observado por microrganismos ou a patógenos veiculados pelo solo (AL-ASKAR & RASHAD, 2010; ABDEL-FATTAH et al., 2011).

Nesse trabalho será dada atenção especial à indução de resistência nos patossistemas: pepino x *Colletotrichum lagenarium* e feijoeiro x *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

Várias plantas, nativas ou exóticas, apresentam alguma atividade sobre agentes fitopatogênicos e, portanto, possuem potencial para serem estudadas para emprego no controle alternativo (SILVA et al., 2010). Entre as plantas que têm merecido estudos para o controle de doenças em plantas está a *Corymbia citriodora* Hill & Johnson (sin. *Eucalyptus citriodora* Hook). É uma árvore aromática perene originária da Austrália (RAO et al., 2003), mais tradicionalmente conhecida como *Eucalyptus citriodora*, foi introduzida no Brasil juntamente com outras espécies de eucaliptos, visando à produção de madeira, principalmente para dormentes e energia. Atualmente é uma das principais espécies cultivadas no Brasil pelos pequenos e médios produtores nos estados de Minas Gerais e São Paulo para a produção de óleo essencial, energia e construções (SILVA et al., 2009a). Além de *C. citriodora*, outras espécies de eucaliptos também têm sido relatadas como medicinais, especialmente *Eucalyptus globulus* (BALMÉ, 2004).

As plantas de *C. citriodora* apresentam folhas pecioladas que quando esmagadas apresentam forte odor em função dos compostos aromáticos e componentes do óleo essencial como o citronelol. Por esse motivo, essa espécie é conhecida popularmente como eucalipto cheiroso ou eucalipto-limão. Esta planta

tem sido relatada como medicinal, sendo que tanto o óleo essencial como o extrato aquoso têm demonstrado atividade medicinal (LORENZI & MATOS, 2002). Folhas e ramos jovens podem apresentar setose, como pequenas cerdas (WORLD AGROFORESTRY CENTRE, 2010) (Figura 1).

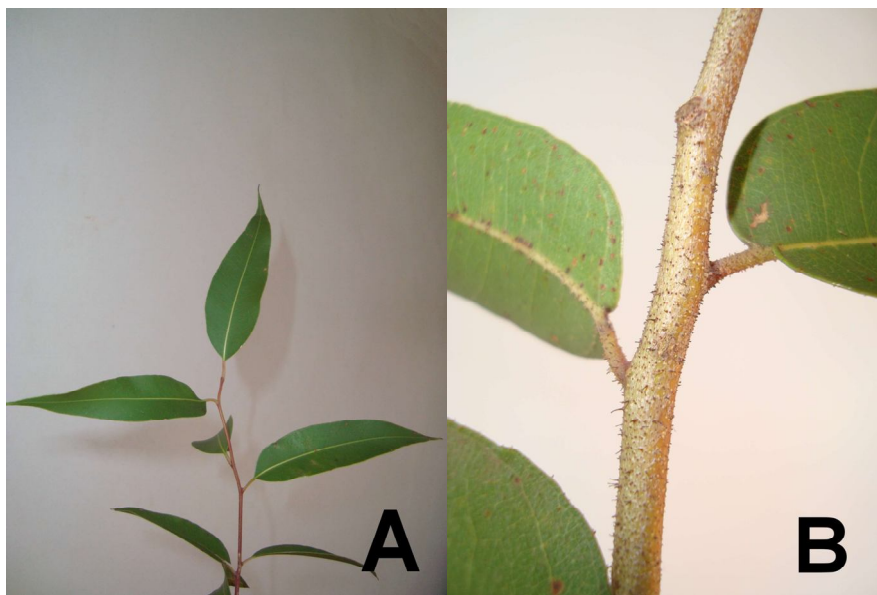


Figura 1. Folhas de *C. citriodora* (A) e detalhe de ramo, pecíolo e folhas jovens apresentando típica setose (B).

A planta medicinal *C. citriodora* possui na sua composição química compostos secundários denominados óleos essenciais, que são extraídos das folhas por arraste de vapor (COSTA, 1986; BOTSARIS; BOORHEM; CORRÊA, 1995; FIORI, 1998). O óleo essencial de *C. citriodora* pode ser utilizado como aromatizante doméstico, na fabricação de desinfetantes, repelentes de insetos e na indústria de perfumes (COSTA, 1986; CRAVEIRO et al., 1981), sendo também utilizado como anti-séptico geral, balsâmico, expectorante, antiespasmódico, hipoglicêmico, febrífugo, estimulante, cicatrizante e parasiticida (LAVABRE, 1993). Além disso, alguns estudos com o óleo essencial têm demonstrado efeito herbicida (BATISH et al., 2004; SINGH et al., 2005) e alelopático sobre plantas espontâneas (EL-ROKIEK & EID, 2009). Dentre seus constituintes químicos, encontram-se o citrionelol (aproximadamente 85 %), geraniol, isopulegol, α e β pineno, cineol, guaiol, estragol,

γ -elemento, nopineno, canfeno, mirceno e β -cimeno (COSTA, 1986). Também, o “kino”, um exsudato espesso e quebradiço encontrado nas cavidades dos caules de *C. citriodora*, que além de atividade medicinal, representa um mecanismo de defesa contra as infecções patogênicas causadas por insetos, fungos ou queimadas (FREITAS; LIMA; SILVEIRA, 2007).

C. citriodora também tem sido empregado na forma de extrato aquoso. Alguns trabalhos utilizando o extrato aquoso de *C. citriodora* têm indicado potencial para o controle alternativo de doenças em plantas. Bonaldo et al. (2004) obtiveram inibição da germinação de esporos e da formação de apressórios de *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *C. citriodora*. Stangarlin et al. (1999) relataram redução entre 14 e 34% na formação de apressórios de *Colletotrichum graminicola* em concentrações do extrato acima de 10%. Resultados expressivos são relatados quanto ao potencial do extrato aquoso em induzir resistência em plantas. Bonaldo et al. (2004; 2007), verificaram que o extrato bruto aquoso de *C. citriodora* foi capaz de induzir a síntese de fitoalexinas em sorgo e soja. Além disso, o extrato aquoso reduziu significativamente o tamanho de lesões causadas por *Colletotrichum lagenarium* em plantas de pepino.

Embora esses estudos relatem o potencial indutor de resistência em plantas, não se dispõe de informações sobre os prováveis mecanismos de ação e de frações com atividade biológica.

2.6 Patossistemas estudados

2.6.1 Antracnose do pepino causada por *Colletotrichum lagenarium*

A antracnose é uma doença muito importante não apenas pela freqüência com que ocorre como também pelos danos que causa à cultura de pepino, chuchu, melão e melancia (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005), sendo até considerada uma das principais doenças nas culturas em todo mundo (TAR'AN; MICHELS; PAULS, 2001).

Nas cucurbitáceas, o agente causal da antracnose é *Colletotrichum lagenarium* (Pass) Ellis & Halsted, que apresenta como sinonímias *C. orbiculare* e *C. gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae*. O fungo produz acérvulos, mais facilmente visíveis

nos frutos. Nas folhas, os acérvulos são formados nas nervuras, principalmente na face inferior. Os conídios são hialinos, unicelulares e protegidos por uma matriz mucilaginosa alaranjada. A fase perfeita raramente ocorre na natureza e corresponde ao ascomiceto *Glomerella cingulata* (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

Os sintomas iniciam-se pelas folhas mais velhas com lesões encharcadas, seguidas de necrose e manchas circulares circundadas por um halo de tecido amarelado. As lesões crescem rapidamente tornando-se marrons com o centro mais claro. Em pecíolos e hastes infectadas, desenvolvem-se lesões deprimidas, alongadas e marrom escuras. A área infectada expande-se, mostrando pontuações escuras no centro, sendo que, em condições de alta umidade, observa-se uma massa de esporos de coloração rosa-alaranjada (REGO & CARRIJO, 2000).

O fungo sobrevive em sementes e restos culturais por vários anos. As sementes contaminadas são responsáveis pela disseminação do patógeno a longas distâncias, enquanto que a disseminação dentro da área de plantio é realizada principalmente por gotas de água de irrigação ou da chuva, as quais carregam os conídios produzidos em acérvulos para plantas vizinhas (BLANCARD; LECOQ; PITRAT, 1996).

Entre as medidas de controle da doença, destacam-se o uso de sementes sadias, destruição de restos de cultura e outras cucurbitáceas, rotação de culturas por dois a três anos e emprego de variedades resistentes. Nos cultivos em estufas plásticas é importante ainda a ventilação diária de modo a evitar a condensação noturna do vapor de água, que favorece a esporulação e infecção pelo patógeno (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).



Figura 2. Sintomas típicos de *Colletotrichum lagenarium* em folha de pepino.

2.6.2 Crestamento bacteriano comum em feijoeiro causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

O agente causal do crestamento bacteriano comum é denominado *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Essa bactéria, quando cultivada em meio ágar nutriente (AN) contendo glicose ou sacarose, apresenta colônias amareladas, de bordos lisos, convexas, brilhantes e circulares. Alguns estudos tem evidenciado a existência de variabilidade na virulência de isolados desse patógeno. Isolados provenientes de regiões tropicais são mais virulentos que isolados oriundos de regiões temperadas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

O crestamento bacteriano comum é uma das principais doenças do feijoeiro (SAETTLER, 2005), sendo considerada uma das principais doenças na cultura em todo o mundo (TAR'AN; MICHAELS; PAULS, 2001; DUNCAN; SINGH; GILBERTSON, 2011), ocorrendo principalmente nas regiões mais úmidas e quentes do globo. Além de sua ampla disseminação, a importância dessa doença se dá principalmente pela agressividade do patógeno e dificuldade para seu controle (SARTORATO & RAVA, 1994).

Os sintomas típicos da doença são visíveis em toda parte aérea das plantas infectadas (SILVA et al., 2008). Inicialmente, são observadas manchas encharcadas nas folhas, que aumentam em tamanho e progridem para necróticas. Essas manchas podem apresentar um pequeno halo amarelado ao seu redor. As lesões podem ocorrer esparsas pelo limbo foliar, bem como na parte marginal, progredindo

para o centro dos folíolos. No caule, podem ser observadas manchas alongadas e encharcadas que se tornam avermelhadas. Em vagens, as lesões variam em forma e tamanho. Inicialmente são encharcadas e circulares, tornando-se necróticas e de coloração avermelhada (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). As sementes podem apresentar descoloração no hilo, manchas amareladas no tegumento, enrugamento e má formação. Sementes chochas e mal formadas podem ser obtidas com facilidade em plantas infectadas (SAETTLER, 2005). No entanto, em alguns casos, sementes infectadas podem ser assintomáticas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Para o controle da doença tem sido recomendadas várias medidas que devem ser adotadas simultaneamente. Dentre elas destaca-se o emprego de sementes de boa qualidade sanitária e a rotação de culturas com plantas não hospedeiras da bactéria por um período mínimo de um ano. Infelizmente, a maioria das variedades de feijoeiro em uso nas diferentes regiões do país são suscetíveis a doença. A eficácia do controle químico do crestamento bacteriano, através de pulverização das plantas com produtos bactericidas, é muito contraditória, sendo que algumas pesquisas desenvolvidas no Brasil evidenciaram a ineficácia de algumas pulverizações nesse sentido (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).



Figura 3. Sintomas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas (A) e sementes (B) (sementes sadias (I) e sementes sintomáticas (II)) de feijoeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Planta medicinal e obtenção do extrato aquoso

As folhas de *C. citriodora* (eucalipto) foram obtidas do horto de plantas medicinais da Universidade Estadual de Maringá/PR. O material vegetal foi coletado no mês de abril de 2009 no horário entre 8:00 e 9:00 horas da manhã. O extrato bruto aquoso com 20% de material vegetal foi obtido conforme Stangarlin et al. (1999). Para tanto, folhas frescas de *C. citriodora* foram coletadas, pesadas e trituradas em liquidificador com água destilada na proporção de 200 g de material vegetal em 1000 mL de água. Este extrato foi então passado em gaze e filtrado em funil de porcelana, utilizando-se papel de filtro Whatman n°. 41.

3.2 Isolamento, manutenção e preparo do inóculo dos fitopatógenos

O fungo fitopatogênico, *Colletotrichum lagenarium*, foi isolado a partir de folhas sintomáticas de pepino coletadas no município de Marechal Cândido Rondon-PR. Para tanto procedeu-se a desinfestação de fragmentos foliares, obtidos a partir da região de transição entre tecido sadio e tecido doente, com hipoclorito de sódio comercial (1%) e disposição dos mesmos em meio de cultivo ágar-água a 2% em placas de Petri. Após a obtenção de culturas puras, o fungo foi transferido para meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) em placas de Petri onde foi mantido a 25°C sob luz fluorescente constante. Para induzir a esporulação do fungo, este foi transferido do meio BDA para o meio de cultivo aveia-ágar, seguido de incubação em placas de Petri a 23°C, sob luz negra (faixa de comprimento de onda em torno de 320 nm) (DI PIERO, 2003). Para o preparo do inóculo, foram adicionados 10 mL de água destilada na placa de Petri contendo o isolado fúngico, seguido de raspagem da colônia com auxílio de espátula. O material foi filtrado em gaze e a suspensão obtida calibrada para 1×10^5 conídios mL⁻¹ com auxílio de câmara de Neubauer. A inoculação das plantas foi realizada através de aspersão. Após a

inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas (ALFENAS & MAFIA, 2007).

A bactéria *Xantomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi isolada de folhas sintomáticas de feijoeiro no município de Marechal Cândido Rondon-PR, sendo cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (5 g peptona; 3 g extrato de carne; 15 g ágar bacteriológico e 1000 mL de água destilada) e mantida a 28°C em escuro por 48 horas quando foram utilizadas para preparo do inóculo. Para a inoculação, foi preparada suspensão bacteriana em solução salina (NaCl a 0,85%) com concentração ajustada para 1×10^8 UFC mL⁻¹, com base em curva de absorvância a 580 nm. A inoculação foi realizada através de aspersão das plantas com o inóculo, sendo mantidas em câmara úmida por seis horas antes e 24 horas após a inoculação, com umidade relativa de 100% (ROMEIRO, 2001). A manutenção da bactéria por períodos prolongados foi realizada através de inoculação e re-isolamento em plantas de feijoeiro.

3.3 Curva de autoclavagem

O extrato bruto obtido, conforme descrito anteriormente, foi submetido a autoclavagem a 121°C a 1 atm, sendo dividido em dois grupos de amostras. Um grupo de amostras foi autoclavado apenas uma única vez por 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 minutos. Outro grupo de amostras foi obtido e autoclavado sequencialmente nos tempos descritos anteriormente. Neste caso, cerca de 500 mL do extrato bruto aquoso foi preparado e aproximadamente 50 mL foram retirados e armazenados (extrato sem autoclavagem). A seguir, o extrato bruto aquoso foi autoclavado por 10 minutos e, após este período, cerca de 50 mL foram retirados e armazenados. A suspensão foi novamente levada a autoclavagem por mais 20 minutos, e após este período cerca de 50 mL foram retirados e armazenados. Este procedimento foi repetido, submetendo o extrato bruto de *C. citriodora* a mais 30, 40, 50 e 60 minutos de autoclavagem.

Após a autoclavagem, as amostras foram centrifugadas a 5.000g por 30 minutos a 4°C. Os precipitados foram descartados e, no sobrenadante (extrato aquoso) resultante, foram dosadas proteínas pelo método de Bradford (1976) e carboidratos (açúcares redutores) pelo método de Lever (1972) (conforme descrito

em 3.8.2 e 3.8.3, respectivamente). Os preparados obtidos, autoclavados ou não, foram avaliados em bioensaio em plântulas de pepino e feijão para avaliação da atividade protetora e indutora de peroxidases.

Em função dos resultados destes bioensaios de proteção, foi escolhido o extrato aquoso sem autoclavagem para ser submetido ao fracionamento e novos bioensaios em pepino e feijão para avaliação da atividade indutora de resistência.

3.4 Bioensaios em plantas de pepino e feijão

Foram realizados ensaios em plantas e em plântulas de pepino e feijão para avaliar a proteção e a indução de enzimas relacionadas à defesa das plantas pelo tratamento com EA de *C. citriodora*. Os ensaios em plantas de pepino foram conduzidos de maneira semelhante a Di Piero e Pascholati (2004), com algumas modificações. Plantas de pepino da cultivar Caipira Esmeralda foram cultivadas em vasos com capacidade para dois litros contendo mistura de solo, matéria orgânica e areia, no volume de 2:2:1, autoclavada por uma hora a 120°C. Após a autoclavagem, esse substrato foi irrigado e mantido por 72 horas em casa de vegetação para eliminar possível efeito fitotóxico. Sementes de pepino foram semeadas nos vasos que foram mantidos em casa-de-vegetação climatizada a 28°C, sendo mantida uma planta por vaso. As plantas foram utilizadas nos bioensaios quando apresentavam duas folhas verdadeiras.

Foram também conduzidos bioensaios em plantas de feijoeiro de maneira semelhante aos ensaios e tratamentos realizados em pepino para permitir maior representatividade dos resultados do efeito do extrato aquoso, bem como a comparação entre os patossistemas. Para os bioensaios, foram utilizadas sementes de feijão IPR-Colibri provenientes do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). As plantas de feijoeiro foram cultivadas em vasos com capacidade para dois litros contendo mistura de solo, matéria orgânica e areia, no volume de 2:2:1, autoclavada por uma hora a 120°C. Sementes de feijão foram semeadas nos vasos e estes mantidos em casa-de-vegetação climatizada com temperatura de 27°C ± 2, sendo conduzida uma planta por vaso. As plantas foram utilizadas nos bioensaios quando apresentavam dois trifólios completamente expandidos.

3.5 Bioensaios em plântulas de pepino e feijão

Foram também conduzidos ensaios em plântulas de pepino e feijão para permitir, principalmente, a avaliação de tratamentos com restrição de volume disponível, como no caso de frações obtidas de cromatografia.

Estes ensaios foram conduzidos de forma semelhante ao realizado por Bonaldo (2005), com algumas modificações. Para tanto, sementes de pepino cultivar Caipira Esmeralda foram semeadas em bandejas com 128 células contendo substrato comercial e mantidas em casa-de-vegetação climatizada com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$. Seis dias após a semeadura os cotilédones das plântulas receberam os tratamentos através de aspersão e foram mantidas em casa-de-vegetação. Após três dias do tratamento elicitor, as plântulas foram inoculadas por aspersão até ponto de escorrimento com suspensão de conídios de *C. lagenarium* (1×10^5 conídios mL^{-1}) e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Outro bioensaio foi conduzido empregando o mesmo procedimento do anterior e com os mesmos tratamentos, porém, nesse caso, três dias após o tratamento, os cotilédones foram coletados, pesados e armazenados a -20°C para posterior análise bioquímica. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições sendo cada repetição composta por quatro plântulas de pepino. A avaliação da severidade da doença foi realizada pela determinação da área lesionada com auxílio do programa computacional QUANT v.1.0.1 (UFV) (VALE et al., 2001).

Foram também conduzidos ensaios em plântulas de feijoeiro nos moldes descritos anteriormente em pepino. Assim, sementes de feijão da cultivar IPR-Colibri foram semeadas em bandejas com 128 células contendo substrato comercial e mantidas em casa-de-vegetação climatizada com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$. Oito dias após a semeadura, quando as plântulas apresentavam duas folhas verdadeiras, estas receberam os tratamentos através de aspersão e foram mantidas em casa-de-vegetação. Três dias após o tratamento elicitor, as plântulas foram inoculadas por aspersão até ponto de escorrimento com solução salina contendo *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (1×10^8 UFC mL^{-1}) e mantidas em câmara úmida por seis horas antes e 24 horas após a inoculação. A avaliação da severidade da doença foi realizada 10 dias após a inoculação pela determinação da área lesionada com auxílio do programa computacional QUANT v.1.0.1 (UFV) (VALE et al., 2001). Outro bioensaio foi

conduzido empregando o mesmo procedimento do anterior e com os mesmos tratamentos, porém, nesse caso, três dias após o tratamento, amostras das folhas foram coletadas, pesadas e armazenadas a -20°C para posterior análise bioquímica. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições sendo cada repetição composta por quatro plântulas de feijoeiro.

3.6 Avaliação da atividade protetora e indutora de enzimas de defesa nas culturas de pepino e feijão tratadas com extrato aquoso

Foram conduzidos bioensaios para avaliar a atividade e os mecanismos de ação do extrato aquoso de *C. citriodora* nos patossistemas pepino x *C. lagenarium* e feijoeiro X. *axonopodis* pv. *phaseoli*.

O extrato aquoso, obtido conforme descrito no item 3.1, foi centrifugado a 20.000 g por 20 min para separar compostos não solúveis. O sobrenadante, considerado extrato aquoso (EA), foi filtrado em membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore). O precipitado foi ressuspenso em água. O extrato aquoso autoclavado ou não, além do precipitado, foram avaliados quanto a atividade protetora e indutora de enzimas de defesa em pepino e feijão conforme descrito no item 3.5. Constituíram testemunhas água destilada e o ativador de plantas acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM).

3.6.1 Avaliação do efeito local e sistêmico

Foi conduzido ensaio em plantas de pepino e feijão conforme descrito no item 3.4. Os tratamentos foram aplicados por aspersão na primeira folha verdadeira em pepino e no primeiro trifólio em feijoeiro. Após determinado intervalo de tempo, as folhas tratadas, bem como a segunda folha verdadeira em pepino e o segundo trifólio em feijão, foram inoculadas com *C. lagenarium* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, respectivamente. Em um grupo de plantas, foi avaliada a severidade da doença. Em outro grupo, onde as plantas não foram inoculadas com o patógeno, foram coletados 10 discos foliares com diâmetro de 1,2 cm cada folha. Estes foram pesados e armazenados a -20°C para análises de atividade enzimática. A inoculação com o patógeno e a coleta das amostras para análises de atividade enzimática foram

realizadas simultaneamente e 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação dos tratamentos. Este procedimento foi realizado na primeira e segunda folha verdadeira em pepino e no primeiro e segundo trifólio em feijoeiro. Foi avaliado o efeito da água destilada e extrato aquoso 20%.

3.6.2 Avaliação da dose de resposta

Este ensaio foi conduzido em plântulas de pepino e feijão conforme descrito no item 3.5. Foram avaliadas as concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20% do EA na atividade protetora e na atividade enzimática em pepino e feijão. Constituíram testemunhas água destilada e ASM (50 mg i.a.L⁻¹).

3.6.3 Efeito do número de aplicações

Este ensaio foi conduzido em plântulas de pepino e feijão conforme descrito no item 3.5. EA autoclavado ou não foram aplicados uma única vez ou em duas aplicações, sendo a segunda três dias após a primeira. A inoculação com o patógeno ou coleta de amostras para atividade enzimática foram realizadas 72 horas após a segunda aplicação. Constituíram testemunhas água destilada e ASM (50 mg i.a.L⁻¹) (aplicados uma única vez).

3.7 Bioensaio de indução de faseolina em feijoeiro

A determinação da faseolina foi realizada conforme a metodologia proposta por Dixon et al. (1983), com algumas modificações. Sementes de feijão variedade IPR-Colibri foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada estéril, semeadas em areia esterilizada por autoclavagem a 120°C por uma hora e mantidas em câmara climatizada a 24°C em escuro por sete dias. Após esse período, foram cortados 5 cm dos segmentos de hipocótilos estiolados das plântulas, lavados em água estéril e mantidos sobre papel absorvente por 30 minutos. Quatro segmentos de hipocótilo (aproximadamente 1g) foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre os hipocótilos, foram pulverizados os tratamentos. As placas de Petri foram mantidas a 25°C em escuro por 48 horas.

Após esse período os hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de etanol, sendo estes mantidos a 4°C por 48 horas para a extração da fitoalexina formada, sendo então agitados por uma hora. O teor de faseolina formada foi medida em espectrofotômetro a 280 nm (BAILEY & BURDEN, 1983). Constituíram testemunhas água destilada e o ativador de plantas acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM).

3.8 Análises bioquímicas para atividades enzimáticas

3.8.1 Obtenção dos extratos enzimáticos

As amostras de tecido foliar, coletadas conforme descrito anteriormente, e armazenadas a -20°C, foram maceradas e homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) contendo 1% (p/p) de PVP (polivinil-pirrolidona), em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000g durante 25 min a 4°C. O sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático, foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteínas e atividade enzimática. Todo o material empregado foi mantido sob refrigeração.

3.8.2 Proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para isso, foram homogeneizados 600 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 µL do extrato enzimático e 200 µL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 125 mL de água destilada). Após 5 min de incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubeta de referência consistiu de 800 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL do reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína ($y=0,0299x + 0,0596$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína com base em albumina de soro bovino). Os resultados foram expressos em mg proteína⁻¹ mL amostra⁻¹.

3.8.3 Açúcares redutores

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado pelo método de Lever (1972), cuja reação envolveu 50 µL da amostra ou extrato enzimático adicionando-se 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico (PAHBAH) 0,5% em NaOH 0,5 M. A mistura foi mantida a 100°C por 10 min e resfriada em banho de gelo. A leitura das absorbâncias foi realizada a 410 nm, em espectrofotômetro, descontando-se os valores de absorbância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se curva-padrão de concentrações de glicose.

3.8.4 Peroxidases

A atividade de peroxidases nas amostras foi determinada espectrofotometricamente pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO & PASCHOLATI, 1999). A mistura de reação foi realizada em cubeta de 3 mL e consistiu de 0,2 mL de extrato protéico e 2,8 mL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio P.A., 12,5 mL de guaiacol a 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)). A reação foi conduzida a 30°C por dois minutos. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância a 470 nm min⁻¹ mg proteína⁻¹. A determinação de proteínas foi realizada conforme descrito no item 3.8.2.

3.8.5 Polifenoloxidasas

A atividade das polifenoloxidasas (PFO) foi determinada conforme a metodologia proposta por Duangmal e Apenten (1999) que consiste em quantificar a oxidação do catecol convertido em quinona. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando-se 900 µL do substrato e 100 µL do extrato enzimático. A reação foi conduzida à temperatura de 30°C acompanhada de leituras em espectrofotômetro, a 420 nm. As leituras foram realizadas de forma direta por um período de 2 min. A diferença entre a leitura no primeiro minuto e a leitura inicial foi

utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.8.6 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100 μL do extrato enzimático foram acrescidos de 400 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Incubou-se essa mistura a 40°C durante 2 h. Ao final desse período adicionaram-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorvância da mistura contendo amostra e do controle (100 μL de extrato enzimático e 900 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico e expressa em mg de ácido trans-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.8.7 β -1,3-glucanases

A atividade de β -1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina conforme a metodologia de Vogelsang e Barz (1993). Para tanto, 150 μL do extrato enzimático foram adicionados a 150 μL de laminarina (2 mg mL^{-1}) em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). Como controle, utilizou-se a mesma reação onde a laminarina foi adicionada imediatamente antes da determinação de açúcares (sem incubação). A reação foi conduzida a 40°C durante 60 min, em banho-maria. Após o período de incubação, os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método de Lever (1972). Para isso, foi retirada uma alíquota de 50 μL dos tubos incubados e adicionado 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) 0,5% em NaOH 0,5 M. A mistura foi mantida a 100°C por 10 min e resfriada em banho de gelo. A leitura das absorvâncias foi realizada a 410 nm, em espectrofotômetro, descontando-se os valores de absorvância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se curva-padrão de

concentrações de glicose. Os valores foram expressos em equivalente mg de glicose h⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.8.9 Quitinases

A atividade da quitinases foi determinada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV” (WIRTH & WOLF, 1990), a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (“Carboxy Methyl-Chitin-Remazol Brilliant Violet”, Loewe Biochemica GmbH) (STANGARLIN; PASCHOLATI; LABATE, 2000). Para isso, foram utilizados 700 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,2) homogeneizados com 100 µL de extrato enzimático e 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2 mg L⁻¹). A mistura foi incubada por 20 min a 40°C, após esse período a reação foi interrompida com 200 µL de HCl 1M, seguido de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g por 6 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 550 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância min⁻¹ mg⁻¹ proteína, descontando-se os valores de absorbancia do branco (800 µL de tampão de extração + 200 µL de “CM-chitin-RBV”).

3.9 Precipitação fracionada do extrato aquoso por sulfato de amônio

Com o objetivo de realizar um fracionamento preliminar, as proteínas presentes em 100 mL do extrato aquoso de *C. citriodora* a 20% foram precipitadas em sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) em saturações de 25%, 50%, 75% e 100%. Para evitar a desnaturação das mesmas, o sal foi dissolvido gradativamente, sob agitação, com a solução mantida a 10°C (IURKIV, 2009). Em cada etapa da precipitação fracionada, após o sal ter sido dissolvido, a solução permaneceu em repouso por uma hora a 10°C (DI PIERO, 2003) e foi centrifugada a 20.000g por 20 min. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 4 mL de água destilada. Em seguida, foi realizada diálise contra água destilada (4°C, 48 horas, três trocas), empregando membrana com limite de exclusão equivalente a 12.000 – 14.000 kDa. O volume de cada precipitado foi ajustado para 5 mL com água destilada. O conteúdo de proteínas das amostras foi quantificado pelo método de Bradford (1976), conforme descrito no item 3.8.2. A dosagem de açúcares redutores foi

realizada pelo método de Lever (1972) (conforme item 3.8.3). As amostras foram utilizadas em bioensaios com plântulas de pepino e feijão para se verificar a proteção contra *Colletotrichum lagenarium* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, respectivamente. Em outro bioensaio, as amostras foram testadas em plântulas de pepino e feijão quanto à indução de peroxidases.

3.10 Separação dos componentes da preparação elicitora bruta através de cromatografia de troca iônica (CTI)

A cromatografia de troca iônica (CTI) foi realizada utilizando-se tampão Tris-HCl ou tampão bicarbonato de amônio com base na metodologia empregada por Bonaldo (2005). Tampão bicarbonato de amônio foi utilizado com o objetivo de evitar a perda de compostos ativos durante a etapa de diálise, necessária quando o material adsorvido a coluna é retirado pela aplicação de NaCl.

Para isto, 100 mL do extrato aquoso foram preparados conforme descrito anteriormente, liofilizados e armazenados para a realização das CTIs. As amostras aplicadas foram ressuspensas no mesmo tampão de equilíbrio da coluna. A liofilização da preparação elicitora foi realizada com o objetivo de se concentrar a amostra a ser aplicada, a fim de obter maior concentração do (s) elicitor (es) presentes nas frações parcialmente purificadas.

Para a aplicação na coluna, o extrato aquoso e todas as outras soluções aplicadas foram previamente filtrados em membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore) e desgaseificados por 10 min. A coluna foi regenerada após cada aplicação de amostra.

3.10.1 Cromatografia de troca iônica utilizando tampão Tris-HCl

A cromatografia de troca iônica foi realizada em coluna de vidro (2,5 x 10 cm) preenchida com Dietilaminoetil-Celulose (DEAE Celulose-Sigma), equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Uma amostra de 5 mL do extrato aquoso foi aplicada ao leito da coluna de DEAE-Celulose e eluída com o tampão de equilíbrio, a fluxo de 2,5 mL min⁻¹. Após a saída do material não adsorvido, o material adsorvido

foi deslocado por gradiente linear de NaCl (0 a 1 M). Frações de 4 mL foram coletadas.

Na tentativa de alterar o modo de eluição das proteínas ligadas à resina DEAE, foi adotado o procedimento “step wise” onde o material adsorvido foi deslocado utilizando-se concentrações crescentes de NaCl no mesmo tampão (0,125 M, 0,25 M, 0,50 M e 1 M). Frações de 4 mL foram coletadas (BONALDO et al., 2007).

Nas frações coletadas a presença de proteínas foi detectada espectrofotometricamente a 280 nm. O conteúdo de açúcares redutores de cada fração foi determinado pelo método de Lever (1972). As frações, reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e carboidratos, foram dialisadas contra água destilada a 4°C, com 6 horas de intervalo entre as trocas de água (3 repetições). Para diálise foi empregada membrana com corte para 12-14 kDa. Após a diálise, as frações foram liofilizadas e ressuspensas em água destilada, sendo o volume final ajustado para 15 mL. O conteúdo de carboidratos e de proteínas foi novamente determinado para as frações obtidas, utilizando os métodos já citados. Alíquotas das frações obtidas foram avaliadas quanto à indução de enzimas relacionadas à defesa e à capacidade de proteção de plântulas de pepino e feijão a *C. lagenarium* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, respectivamente.

3.10.2 Cromatografia de troca iônica utilizando tampão bicarbonato de amônio

A CTI foi realizada em coluna de vidro (2,5 x 10 cm) preenchida com Dietilaminoetil-Celulose (DEAE Celulose-Sigma), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,0. Uma amostra de 5 mL do extrato aquoso ressuspenso no mesmo tampão de equilíbrio da coluna foi aplicada no leito da coluna de DEAE-Celulose e eluída com o tampão de equilíbrio (bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,0), a fluxo de 2,5 mL min⁻¹. Após a saída do material não adsorvido, o material adsorvido foi deslocado por gradiente linear de bicarbonato de amônio (0 a 1 M). Frações de 4 mL foram coletadas.

Na tentativa de alterar o modo de eluição das proteínas ligadas à resina DEAE, foi adotado o procedimento “step wise”, onde o material adsorvido foi

deslocado utilizando-se concentrações crescentes de bicarbonato de amônio no mesmo tampão (0,125 M, 0,25 M, 0,50 M e 1 M). Frações de 4 mL foram coletadas.

Nas frações coletadas, a presença de proteínas foi detectada espectrofotometricamente a 280 nm. O conteúdo de açúcares redutores de cada fração foi determinado pelo método de Lever (1972). As frações, reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e carboidratos, foram liofilizadas e ressuspensas em água destilada, sendo o volume final ajustado para 15 mL. O conteúdo de carboidratos e de proteínas foi novamente determinado para as frações obtidas, utilizando-se os métodos já citados. Alíquotas das frações obtidas foram avaliadas quanto à indução de enzimas relacionadas à defesa e à capacidade de proteção de plântulas de pepino e feijão a *C. lagenarium* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, respectivamente.

3.11 Cromatografia de filtração em gel (CFG)

As frações com maior atividade protetora em plântulas de pepino e feijão foram submetidas ainda ao fracionamento por CFG. Esta foi realizada em coluna de vidro (1 x 30 cm) preenchida com Sephacryl S-100 (Sigma), formando um gel sedimentado. Amostras de 1 mL provenientes da CTI foram aplicadas sobre o leito da coluna e eluídas com tampão fosfato 10 mM, pH 6,8, sendo coletadas frações de 1 mL em fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O monitoramento das frações foi efetuado a 280 nm. As frações em que se detectou a presença de proteínas foram reunidas de acordo com o perfil de eluição e foram testadas quanto à capacidade elicitora e protetora em plântulas de pepino e feijão.

A massa molecular relativa de cada fração detectada foi estimada utilizando-se a curva de calibração (FIORI-TUTIDA, 2003) $y = 1519e^{-3,16x}$ ($R^2=0,99$), onde y é a massa molecular relativa e x é o quociente do volume de eluição dessas proteínas, pelo "void volume" (V_e/V_0).

3.12 Caracterização parcial das frações com atividade biológica

Para contribuir na caracterização parcial dos indutores de resistência presentes no EA de *C. citriodora*, as frações que apresentaram atividade biológica em pepino

ou feijoeiro foram avaliadas quanto à estabilidade à digestão enzimática e a estabilidade térmica (100°C por 10 min) (AYERS et al, 1976).

Para a avaliação da estabilidade à digestão enzimática, foi realizado tratamento com proteínase K, onde 5 mL da fração de interesse foram incubados a 38°C na presença de 50 µL da solução de proteínase (5 µg µL⁻¹) por 12 horas, seguido pela adição de mais 50 µL da solução de proteínase e incubação por mais 10 horas. Posteriormente, o material foi aquecido a 100°C por 10 min e efetuada a adição de 200 µL de tolueno por amostra para se evitar a contaminação por microrganismos. Após a fervura, as amostras foram submetidas à evaporação (43°C) a vácuo por 1 hora e, então, diluídas para um volume final de 10 mL, sendo então utilizadas nos bioensaios.

3.13 Análise dos dados

Os resultados obtidos nos bioensaios foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados da dose de resposta do extrato aquoso foram submetidos a análise de regressão. As análises foram realizadas com auxílio do sistema computacional SISVAR versão 5.0 (Sistema de análise estatística-UFLA) (FERREIRA, 2007).

4. RESULTADOS

4.1 Curva de autoclavagem do extrato aquoso

Durante o preparo do extrato bruto aquoso de *Corymbia citriodora* para emprego nos ensaios, foi realizada pré-filtragem em gaze e após em papel de filtro quantitativo. O extrato obtido apresentava coloração esverdeada (Figura 4 A). No entanto, para auxiliar na purificação bem como na filtragem e esterilização a frio em membrana tipo Millipore, foi realizada centrifugação em alta rotação. O sobrenadante obtido após filtragem em membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro apresentou coloração amarelada (Figura 4 B). Este extrato foi denominado extrato aquoso (EA). Após o processo de autoclavagem, o EA apresentou escurecimento (Figura 4 C) que se intensificou conforme aumento do tempo de autoclavagem.

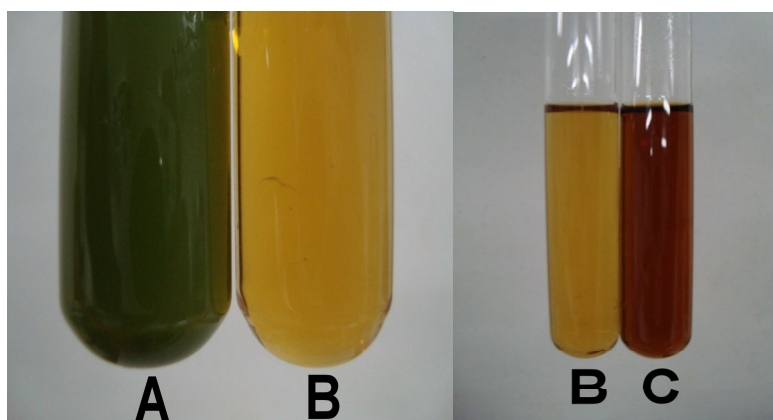


Figura 4. Extrato aquoso de *Corymbia citriodora*. Extrato apenas filtrado em gaze e papel de filtro quantitativo (A). EA centrifugado a 20.000 g por 20 min e filtrado em membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro (B) (Millipore). EA autoclavado por 20 min a 120°C obtido de forma idêntica ao extrato B (C).

O conteúdo de proteínas e de açúcares redutores presentes no extrato aquoso submetido aos diferentes tempos de autoclavagem uma única vez ou sequencialmente são apresentados na Figura 5. O conteúdo de açúcares redutores

tendeu a aumentar conforme o aumento no tempo de autoclavagem quando submetido a autoclavagem sequencialmente (Figura 5A). Com relação ao conteúdo de proteínas, houve poucas alterações em função do processo de autoclavagem (Figura 5B).

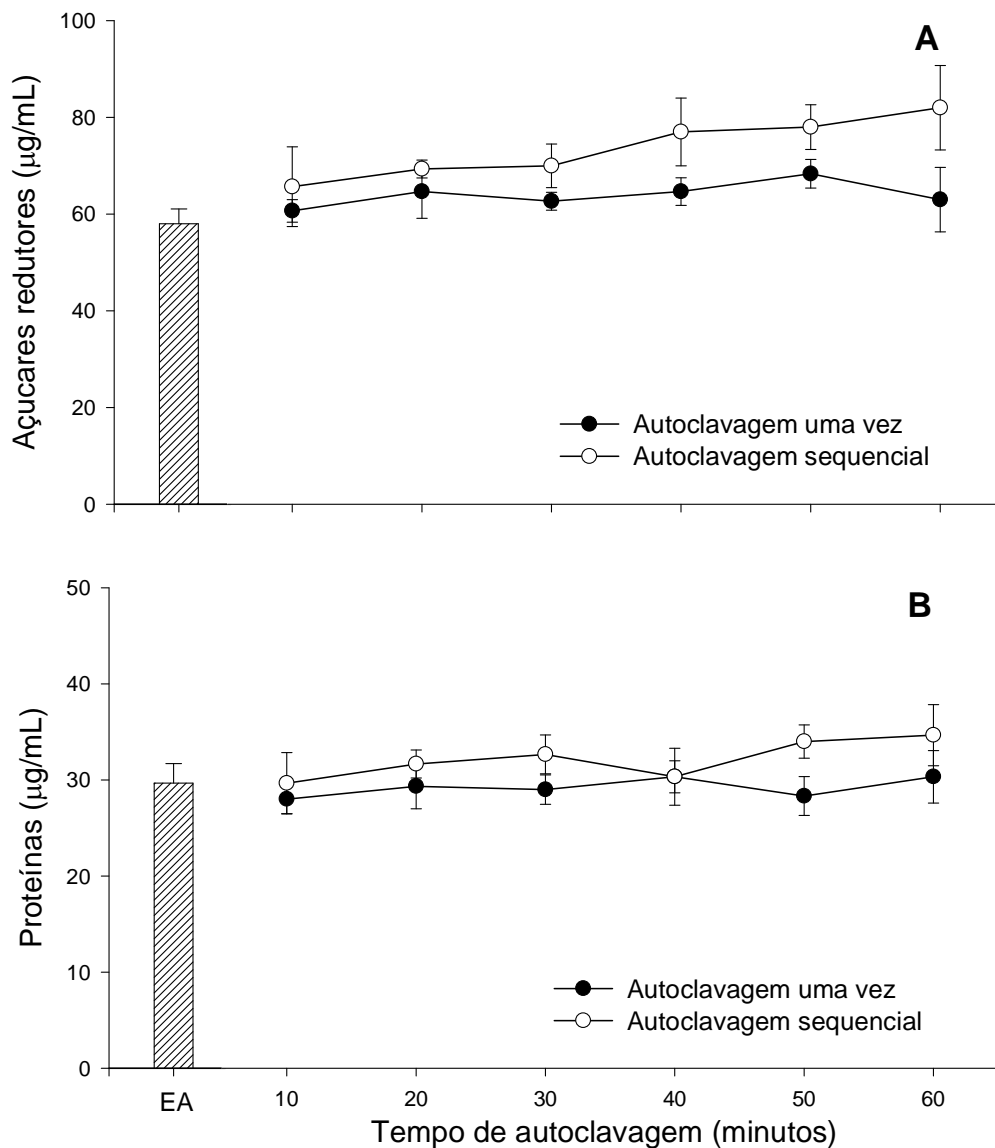


Figura 5. Conteúdo de açúcares redutores (A) e proteínas totais (B) no extrato aquoso de *Corymbia citriodora* submetido à autoclavagem uma vez ou sequencial. Barras representam o erro padrão da média.

Com relação à atividade do extrato aquoso de *C. citriodora* submetido aos diferentes tempos de autoclavagem, houve poucas alterações sobre a severidade de *C. lagenarium* em cotilédones de pepino que receberam os tratamentos (Figura 6A). No entanto, observa-se que houve a tendência de redução na atividade quando o extrato foi submetido a autoclavagem sequencialmente, com aumento na severidade da doença em 23,2 e 25,7% nos tempos de 50 e 60 minutos, respectivamente, quando estes foram submetidos a autoclavagem sequencial em relação ao extrato sem autoclavagem.

Este resultado foi pertinente com a atividade de peroxidases. Da mesma forma, o processo de autoclavagem provocou redução de 37,6 e 39,4% na indução de peroxidases em cotilédones tratados com extrato submetido à autoclavagem sequencial por 50 e 60 minutos, respectivamente, em relação ao extrato não submetido à autoclavagem (Figura 6B).

No patossistema feijoeiro e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, os resultados foram semelhantes aos obtidos na cultura de pepino, porém, nesse caso, a redução na atividade do extrato pela autoclavagem não pôde ser verificada.

Pode-se observar na Figura 7 que, os valores de severidade da doença e da atividade de peroxidases tenderam a se manter próximos aos obtidos com o emprego do extrato aquoso sem autoclavagem.

Diante desses resultados, pela ausência de um tempo de autoclavagem que promovesse aumento na atividade do extrato, foi selecionado o extrato aquoso sem autoclavagem para maiores estudos da atividade indutora de resistência em pepino e feijão bem como para fracionamento e bioensaios de caracterização de frações com atividade.

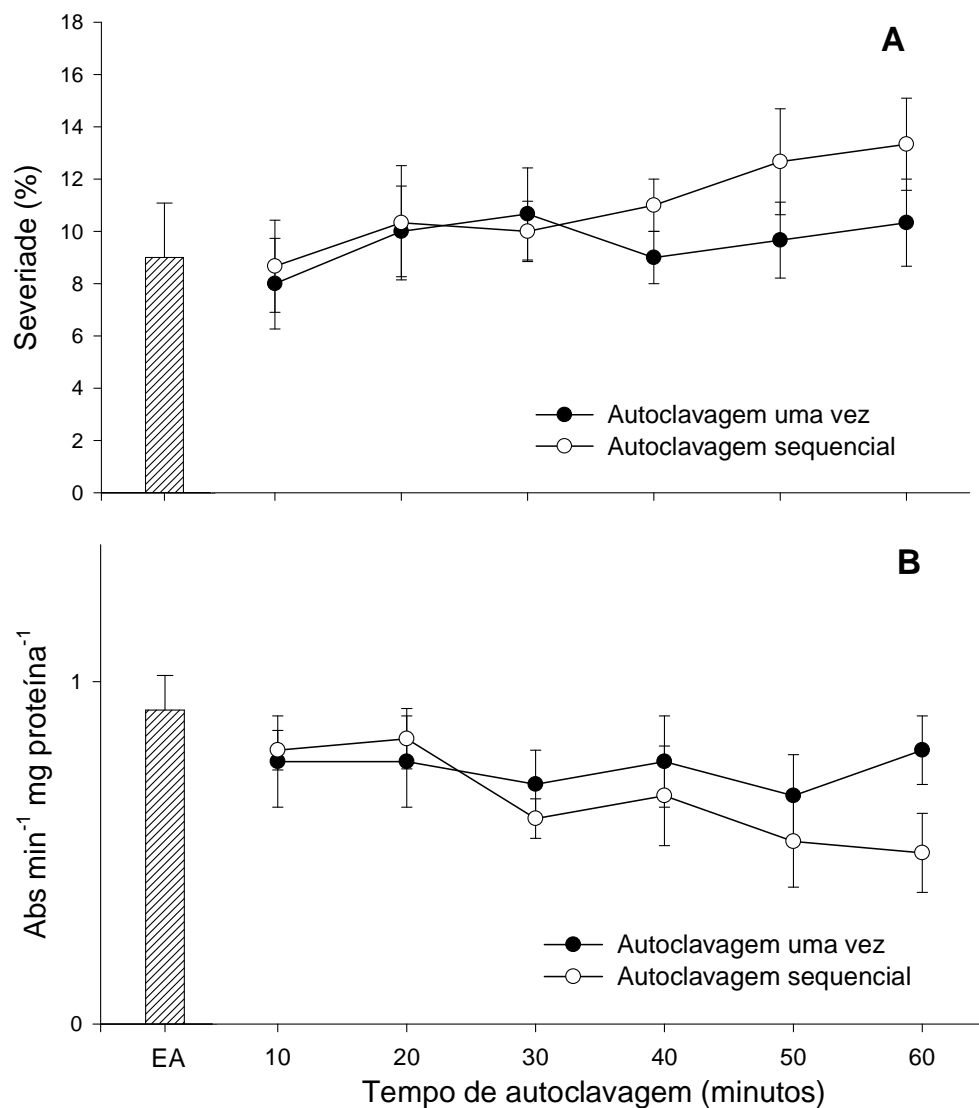


Figura 6. Severidade de *Colletotrichum lagenarium* (A) e atividade de peroxidases (B) em cotilédones de pepino tratados com extrato aquoso (EA) de *Corymbia citriodora* submetido à autoclavagem uma vez ou sequencial. Barras representam o erro padrão da média.

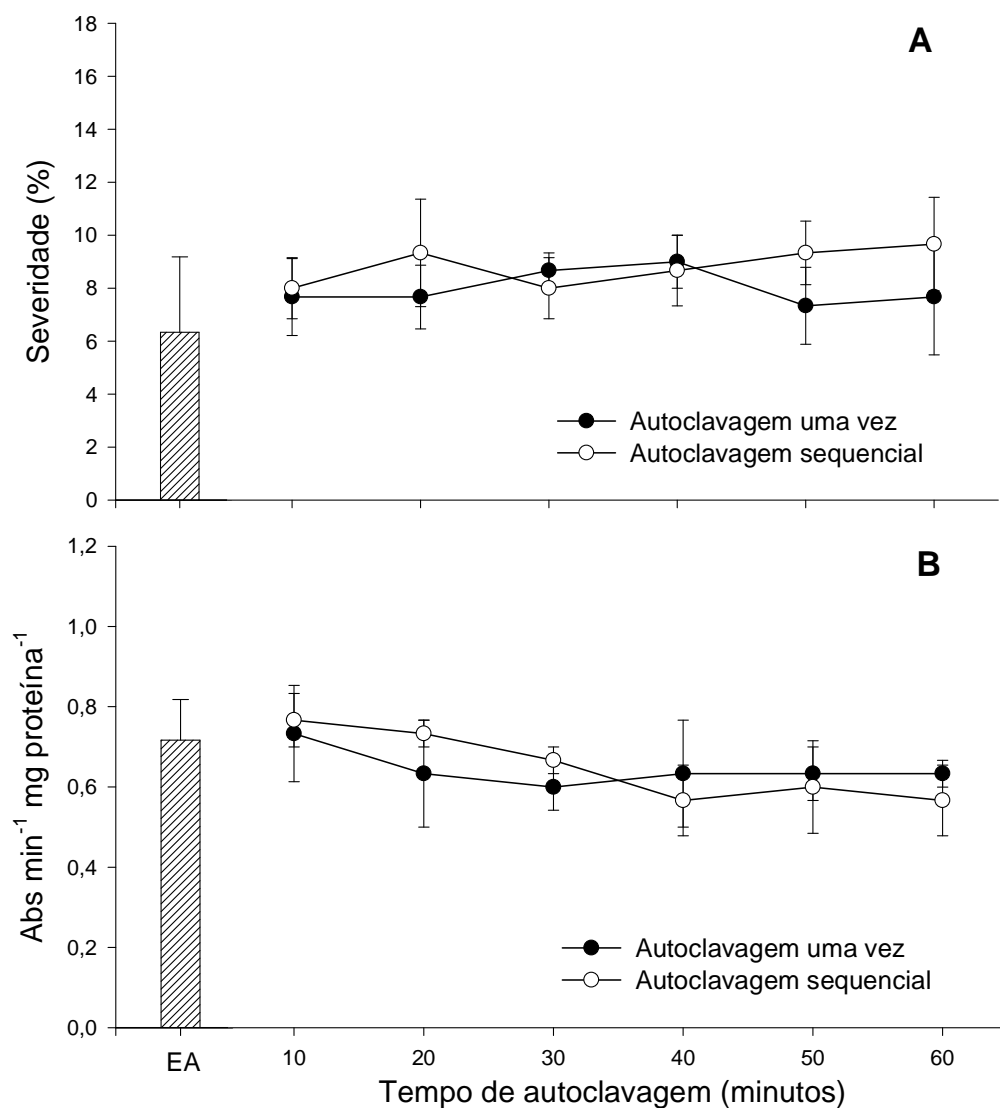


Figura 7. Severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (A) e atividade de peroxidases (B) em plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (EA) de *C. citriodora* submetido à autoclavagem uma vez ou sequencial. Barras representam o erro padrão da média.

4.2 Efeito protetor e indutora de enzimas de defesa em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro pelo extrato aquoso de *C. citriodora*

Estes bioensaios foram conduzidos para melhor compreender a atividade do extrato aquoso nos patossistemas estudados.

Em cotilédones de pepino, ASM, EA e o EA autoclavado reduziram significativamente a severidade da antracnose em 49,6, 37,6 e 39,6%, respectivamente, em relação à testemunha tratada apenas com água destilada (Figura 8).

Em feijoeiro, os EAs, autoclavado ou não, apresentaram valores intermediários de severidade entre as testemunhas água destilada e ASM, mas não diferiram dessas. ASM, por sua vez, promoveu redução de 39,8% na severidade do crestamento bacteriano.

Em ensaios preliminares, concentrações de acibenzolar-S-metil superiores 50 mg i.a. L⁻¹ mostraram fitotoxicidade em cotilédones de pepino e plântulas de feijão causando início de necrose do tecido foliar.

O precipitado ressuspenso resultante da centrifugação do extrato aquoso a 20.000g por 30 min não apresentou efeito sobre a severidade das doenças nem sobre a atividade de enzimas relacionadas à defesa da planta para ambos patossistemas estudados (Figura 8).

Com relação a atividade de peroxidases, tanto ASM e EA promoveram significativo incremento na atividade dessas enzimas que foi de 83,6 e 67,2% superior, respectivamente, em relação à testemunha água em cotilédones de pepino (Figura 9). O EA autoclavado teve efeito inferior ao extrato não autoclavado, mas ainda assim foi superior à testemunha água em 14,6%. Em folhas de feijoeiro os resultados foram semelhantes aos obtidos em pepino, porém um pouco menos expressivos. Nesse caso, ASM e EB promoveram indução de 30,0 e 31,9%, respectivamente, em relação à testemunha água. Estes resultados revelam um importante alvo de ação de elicitores presentes no extrato aquoso de *C. citriodora*.

Com relação à β -1,3-glucanases, o EA também manifestou efeito (Figura 10). Em cotilédones de pepino, tanto ASM quanto o EA promoveram incremento nessa enzima, que foi de 139,0 e 122,7% em relação à testemunha água destilada. Já em

folhas de feijoeiro, apenas ASM promoveu aumento significativo na atividade dessa enzima.

Para quitinase, nenhum dos tratamentos promoveu aumento significativo na atividade dessa enzima, tanto em cotilédones de pepino quanto em folhas de feijoeiro (Figura 11). Esses resultados sugerem que a ação do EA de *C. citriodora* nessas plantas não envolva, pelo menos de forma expressiva, a atividade dessa enzima, embora o ativador de plantas também não tenha promovido aumento significativo na atividade.

Quanto a atividade de polifenoloxidasas, apenas o ativador de plantas ASM promoveu aumento significativo na atividade dessa enzima, que ocorreu tanto em cotilédones de pepino bem como em folhas de feijoeiro (Figura 12). Por outro lado, o resultado do EA não diferiu estatisticamente do obtido pelo ASM e manifestou uma sensível efeito sobre essa enzima ao apresentar efeito 88,4% superior ao apresentado pelo precipitado.

Os resultados da atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) são apresentados na Figura 13. Observa-se que em folhas de feijoeiro não foi verificada alteração significativa na atividade dessa enzima em função dos tratamentos. Já em cotilédones de pepino, ASM e EA foram capazes de estimular a atividade dessa enzima em 16,2 e 18,5%, respectivamente.

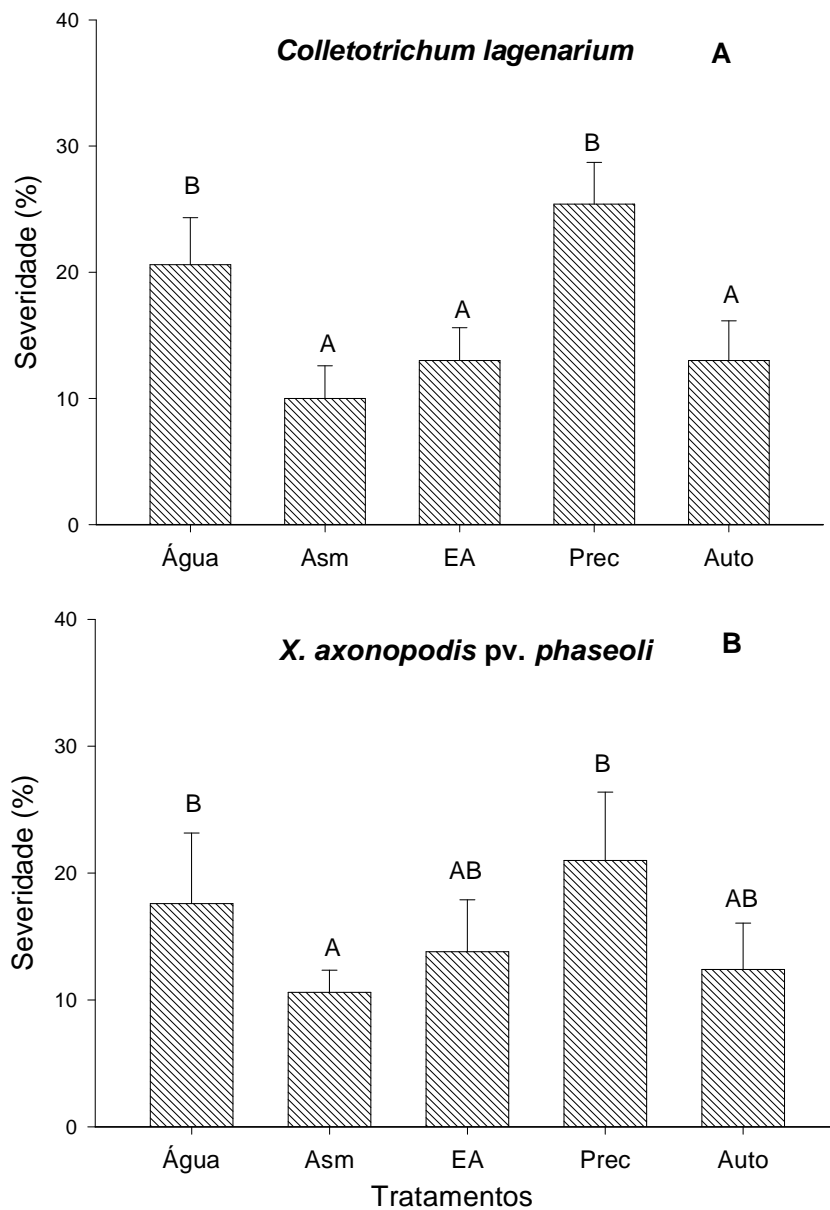


Figura 8. Severidade da antracnose em cotilédones de pepino (A) e do crestamento bacteriano em plântulas de feijoeiro (B) tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

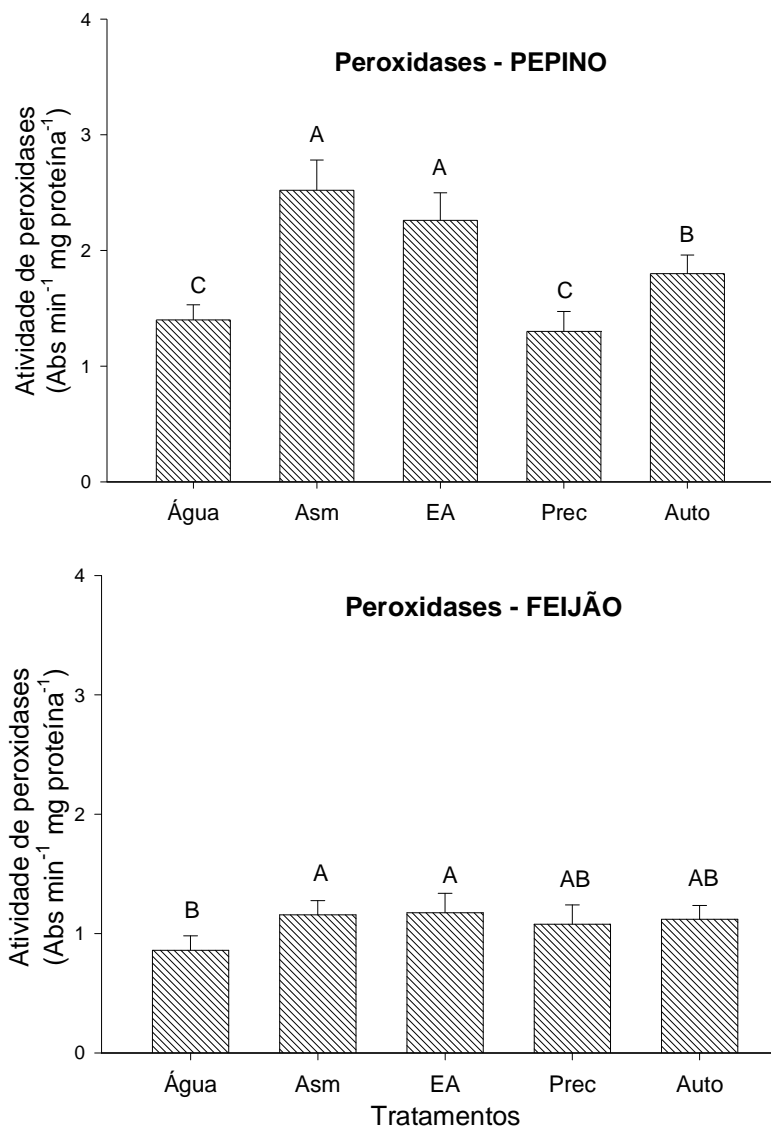


Figura 9. Atividade de peroxidases em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

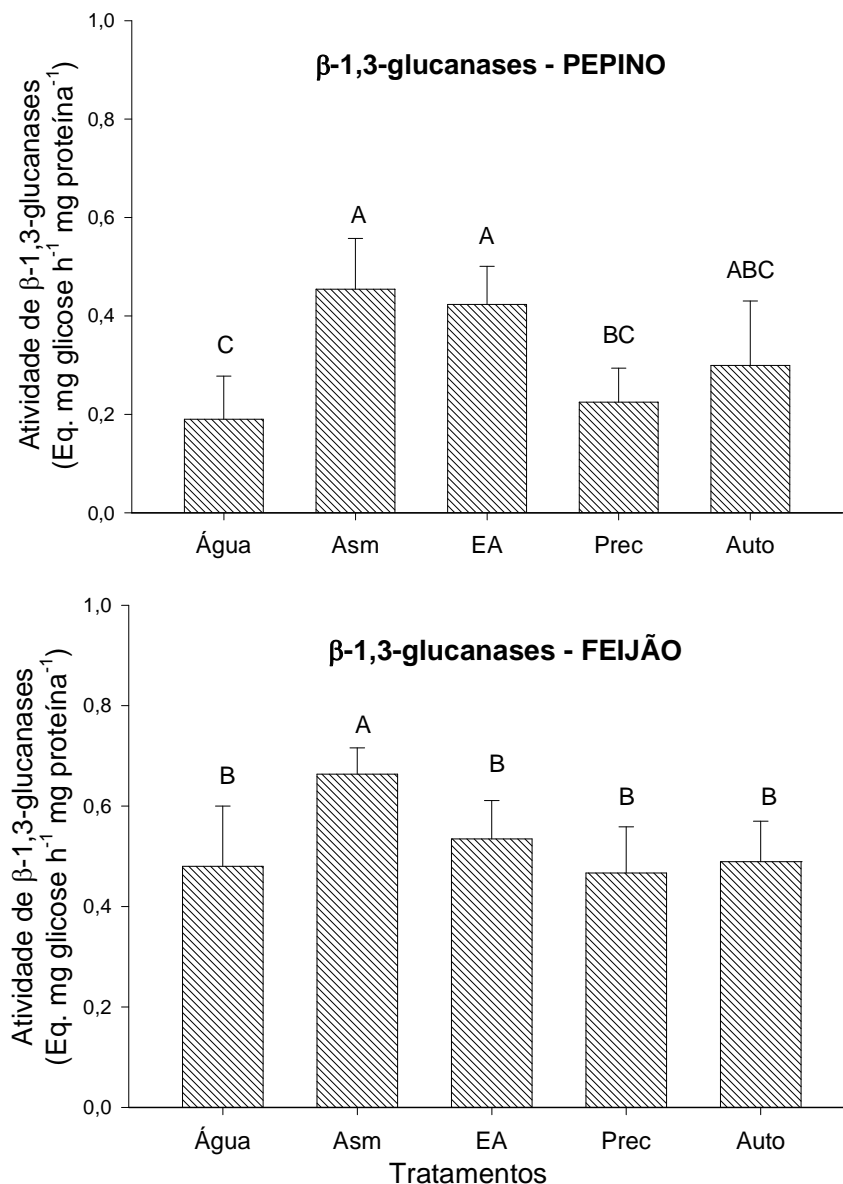


Figura 10. Atividade de β -1,3-glucanases em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspensão em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

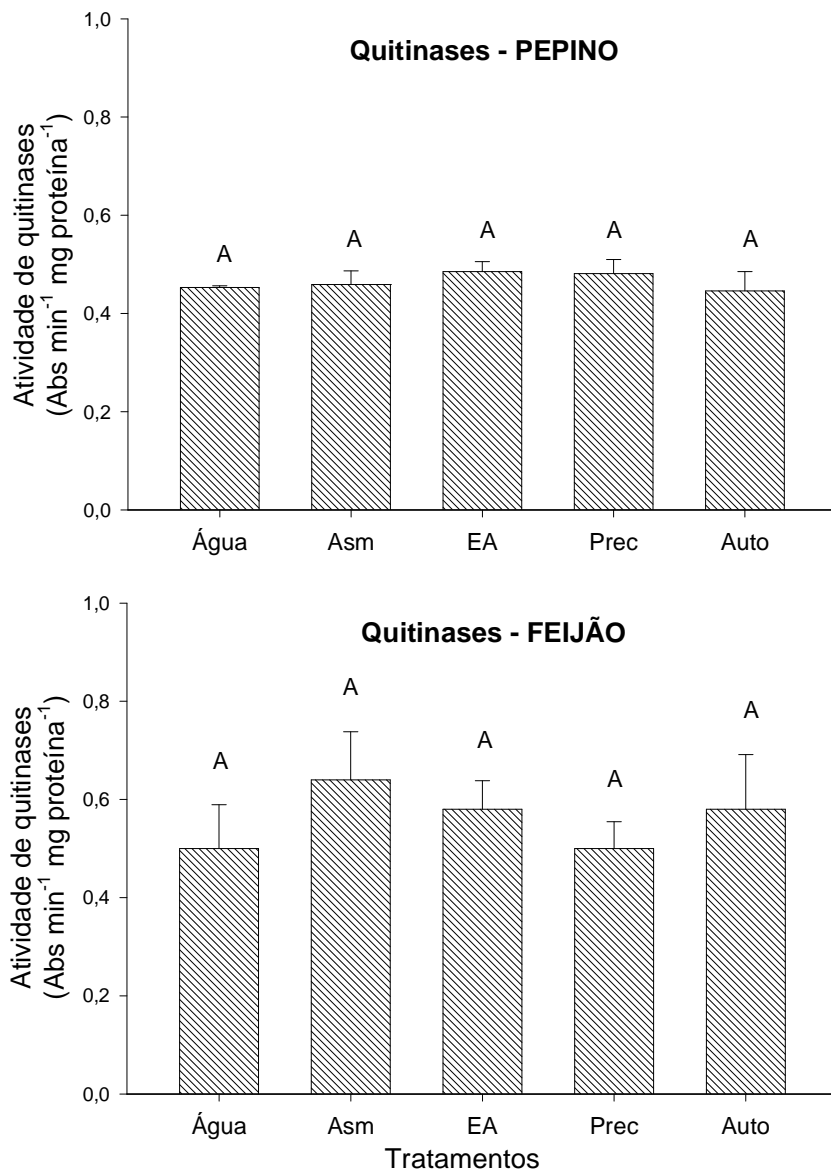


Figura 11. Atividade de quitinases em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

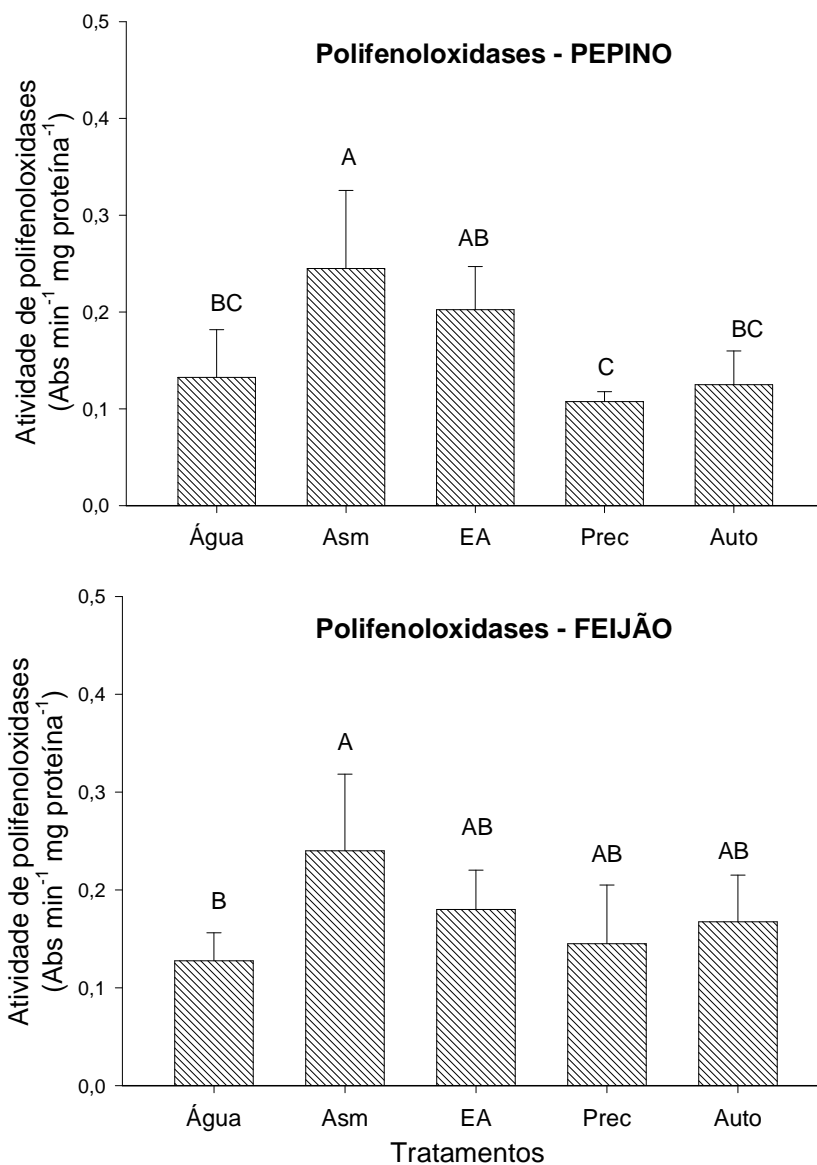


Figura 12. Atividade de polifenoloxidasas em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

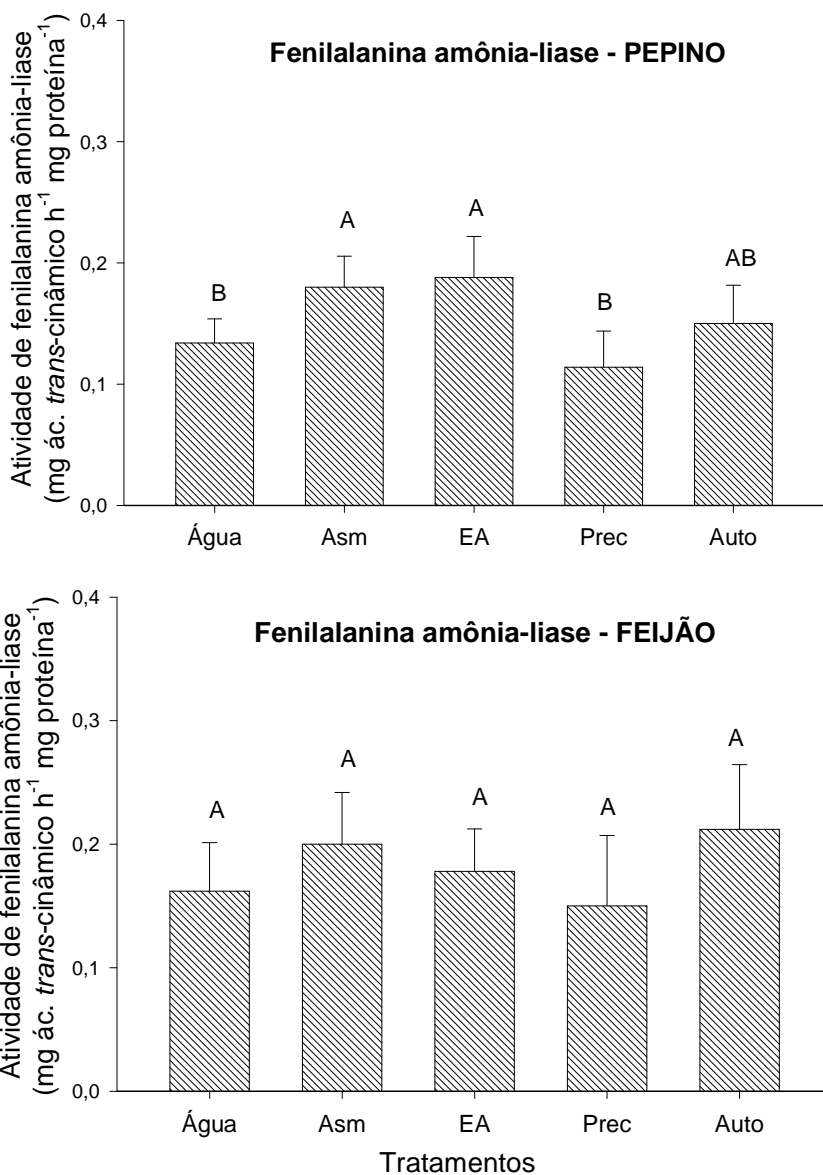


Figura 13. Atividade de fenilalanina amônia-liase em cotilédones de pepino e plântulas de feijoeiro tratadas com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). Amostragem realizada 72 horas após os tratamentos. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em feijão, além da atividade de enzimas relacionadas à defesa da planta, foi também avaliado o acúmulo da fitoalexina faseolina em hipocótilos estiolados de feijoeiro. Os resultados mostraram que apenas EA e EA autoclavado promoveram incremento no acúmulo dessa fitoalexina, cujo conteúdo foi 78 e 69% superior em relação à testemunha água, respectivamente (Figura 14). O ativador de plantas ASM não mostrou atividade na indução da síntese dessa enzima. Estes resultados indicam o potencial do EA na ativação desse mecanismo de defesa em feijoeiro, cuja atividade não foi afetada pela autoclavagem, manifestando a presença de elicitores termoestáveis.

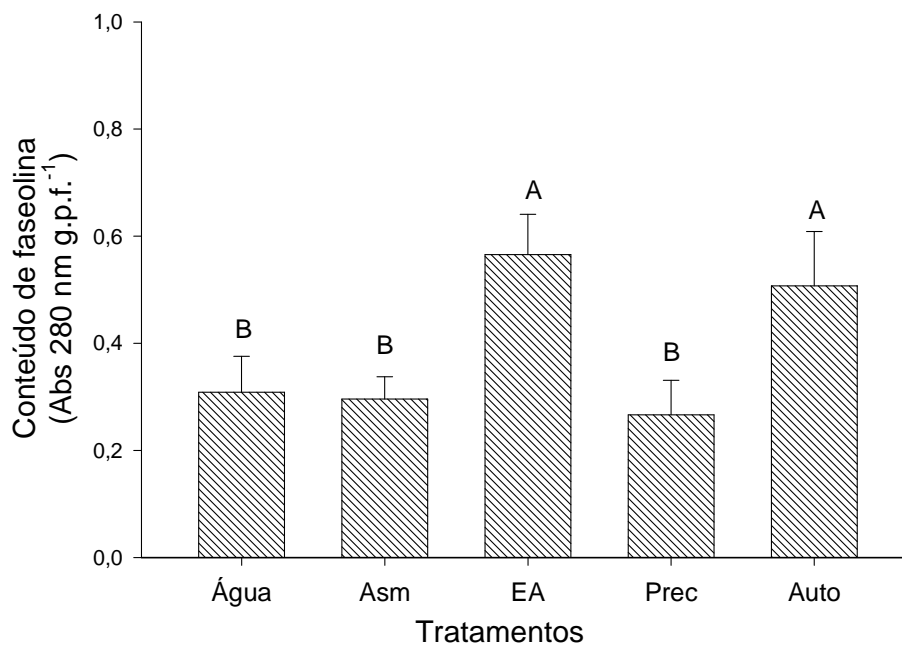


Figura 14. Acúmulo de faseolina em hipocótilos estiolados de feijoeiro tratados com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. EA: extrato aquoso; Prec: precipitado da centrifugação do EA ressuspenso em água; Auto: EA autoclavado. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (ASM). As barras representam as médias ± erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2.1 Atividade local e sistêmica em plantas de pepino e feijão

Estes bioensaios foram conduzidos em condições de casa de vegetação com plantas de pepino e feijão cultivadas em vasos. O primeiro trifólio de feijoeiro bem como a primeira folha completamente expandida de pepino receberam os tratamentos com extrato aquoso a 20% ou água destilada. Concomitantemente, 24, 48, 72 e 96 horas após os tratamentos, foram coletadas amostras do tecido foliar da primeira folha tratada bem como da segunda folha não tratada, ou foram inoculadas com o patógeno.

Nas folhas tratadas de pepino, houve redução na severidade da antracnose no tempo de 72 e 96 horas em relação às folhas que receberam apenas água (Figura 15), manifestando efeito protetor local. Já na segunda folha, que não recebeu os tratamentos, não foi observada diferença significativa na proteção entre folhas tratadas com EA ou apenas água.

Resultados semelhantes foram obtidos com relação à atividade de peroxidases (Figura 16). Nesse caso, o efeito do EA foi mais evidente sendo que 48 horas após o tratamento já foi observada indução de peroxidases. Também para peroxidases nas folhas que não receberam os tratamentos, não foi observada diferença significativa entre eles.

Em plantas de feijoeiro, não foi observada diferença significativa na severidade do cretamento bacteriano entre as plantas tratadas com EA daquelas que receberam apenas água (Figura 17). De forma semelhante ao que ocorreu em pepino, não foi observada diferença entre os tratamentos quando avaliado o segundo trifólio o qual não foi tratado.

Para peroxidases, o EA promoveu significativo aumento nas atividades 72 e 96 horas após as folhas de feijoeiro receber os tratamentos (Figura 18). Porém, assim como em pepino, não foi observada diferença na atividade enzimática nas folhas não tratadas.\

A atividade do EA apenas nas folhas tratadas sugere a ação prioritariamente local do extrato, com ausência ou limitada ação sistêmica nas condições de análise desse trabalho.

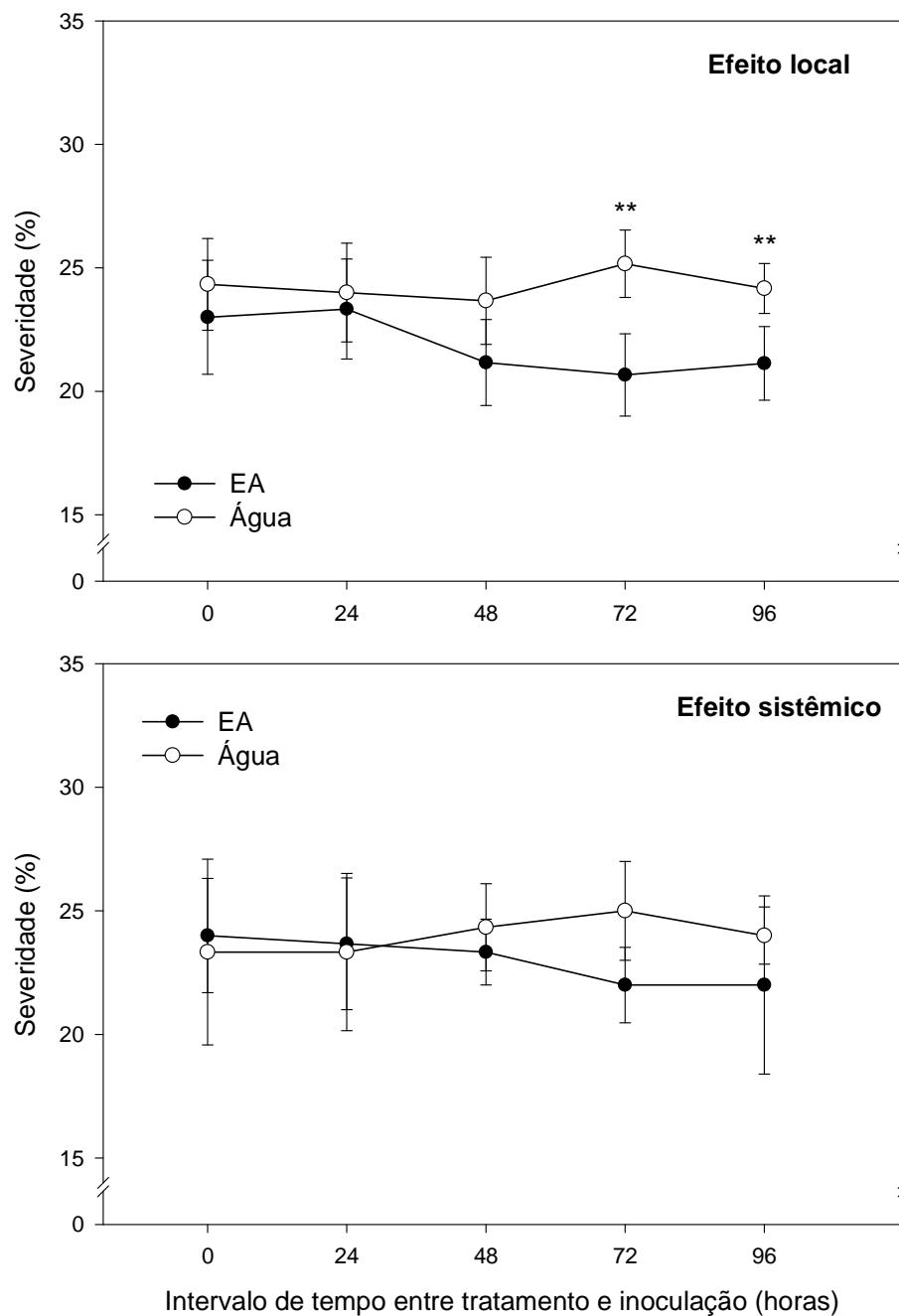


Figura 15. Efeito da aplicação do extrato aquoso (EA) de *Corymbia citriodora* sobre a severidade da antracnose em plantas de pepino em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a inoculação com *Colletotrichum lagenarium*. Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média. **Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

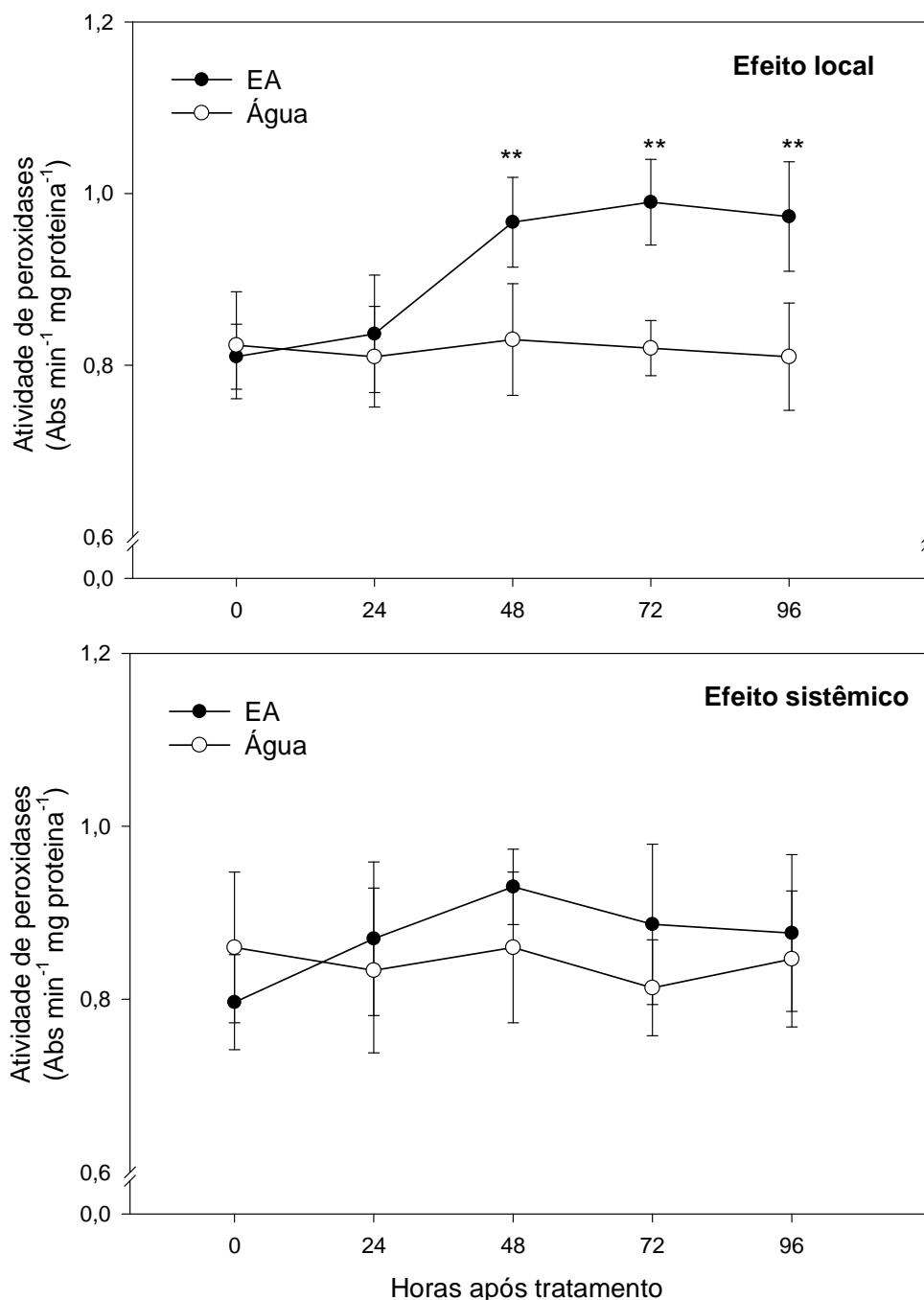


Figura 16. Efeito da aplicação do extrato aquoso (EA) de *Corymbia citriodora* sobre a atividade de peroxidases em plantas de pepino em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a amostragem para atividade enzimática. Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média. **Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

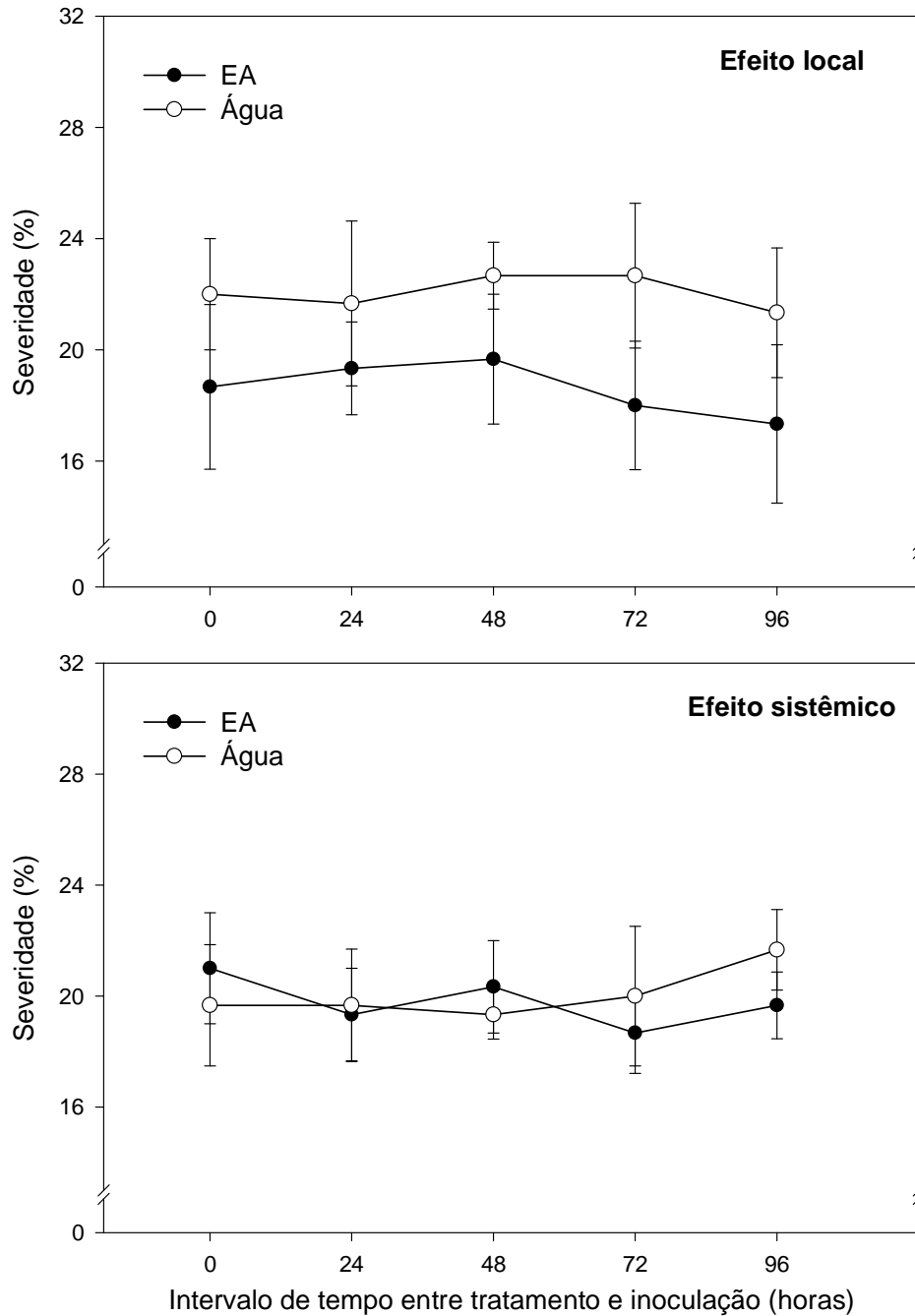


Figura 17. Efeito da aplicação do extrato aquoso (EA) de *Corymbia citriodora* sobre a severidade do crestamento bacteriano em plantas de feijoeiro em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a inoculação com *Colletotrichum lagenarium*. Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média.

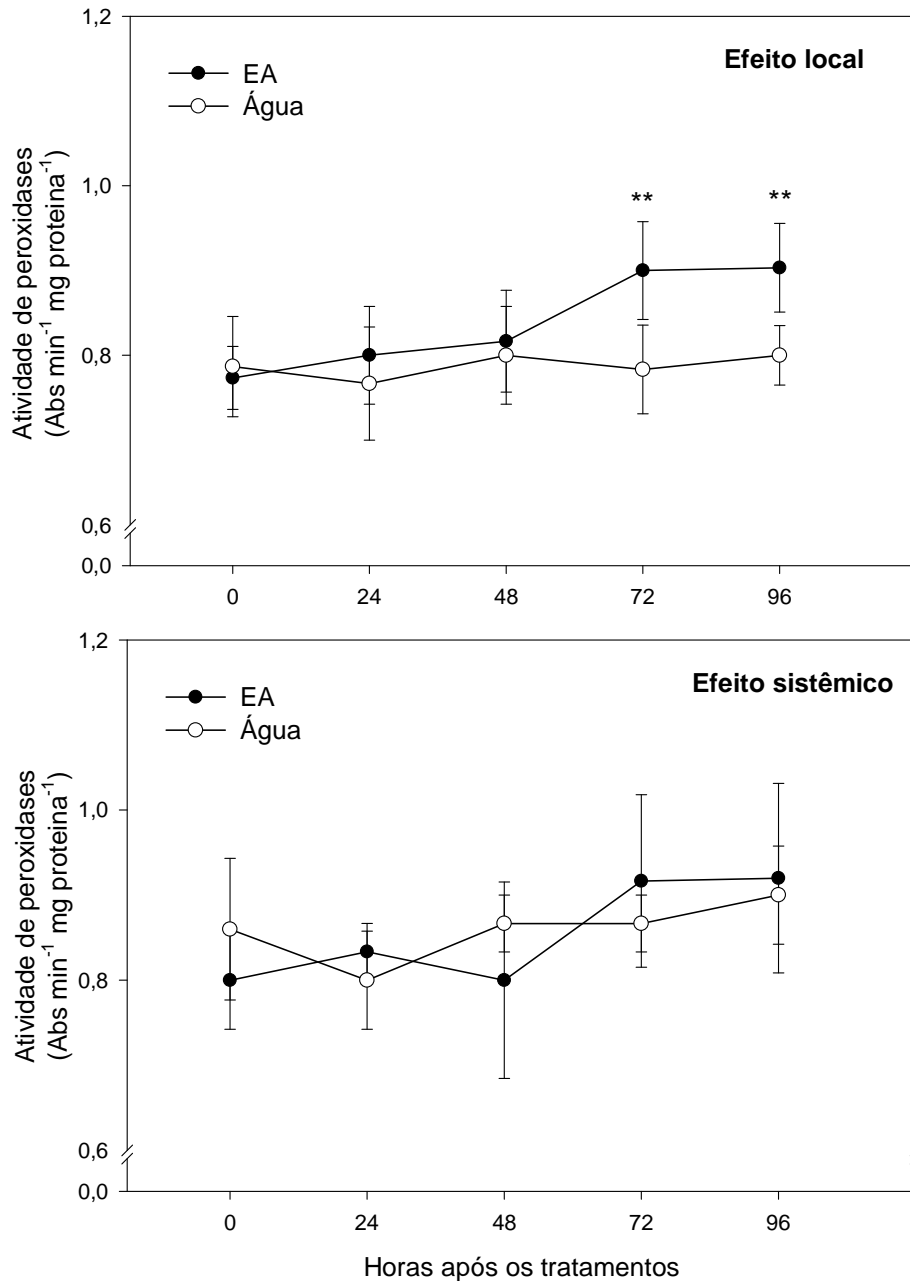


Figura 18. Efeito da aplicação do extrato aquoso de *Corymbia citriodora* sobre a atividade de peroxidases em plantas de feijoeiro em função de diferentes horas de intervalo entre o tratamento indutor e a amostragem para atividade enzimática. Efeito local: primeiro trifólio tratado; Efeito sistêmico: segundo trifólio não tratado. Barras representam o erro padrão da média. **Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2.2 Avaliação da dose de resposta em plântulas de pepino e feijão

As concentrações do EA permitiram significativo ajuste quadrático na redução da severidade da antracnose com ponto de mínima severidade na concentração de 13,1% do EA (Figura 19). A redução na severidade foi pertinente com o aumento na atividade de peroxidases, com ponto de máxima atividade obtido na concentração de 17,5% do EA. Observa-se que resultados mais expressivos foram obtidos a partir da concentração de 5% do EA.

Em feijoeiro observou-se a mesma tendência (Figura 20), porém, nesse caso, para a severidade do cretamento bacteriano, não houve diferença significativa para as concentrações utilizadas. No entanto, para peroxidases, houve aumento na atividade dessa enzima com ponto de máxima na concentração de 13,5% do EA.

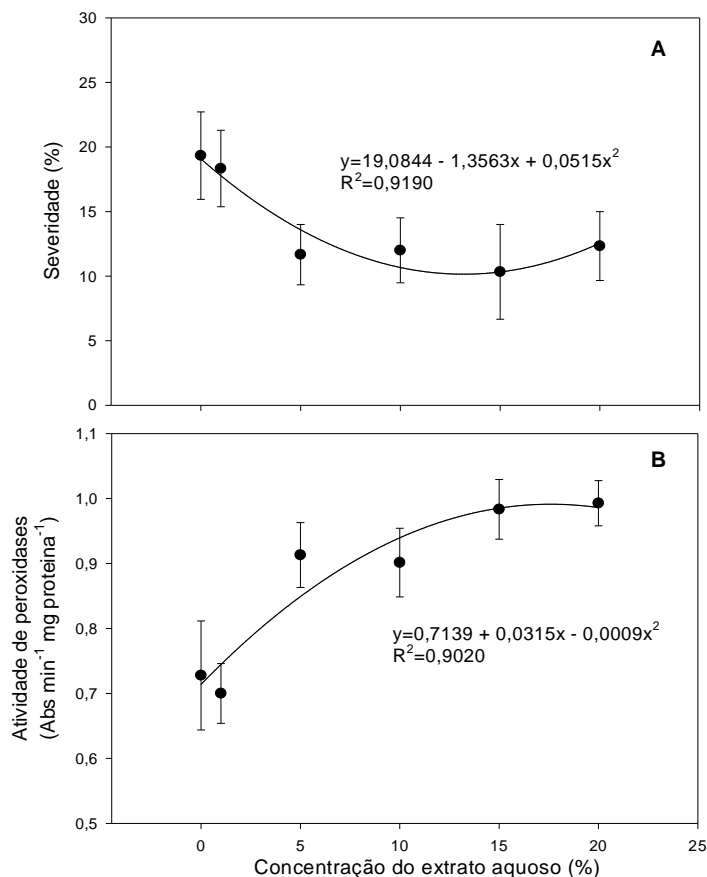


Figura 19. Severidade da antracnose (A) e atividade de peroxidases (B) em cotilédones de pepino tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Corymbia citriodora*. Barras representam o erro padrão da média.

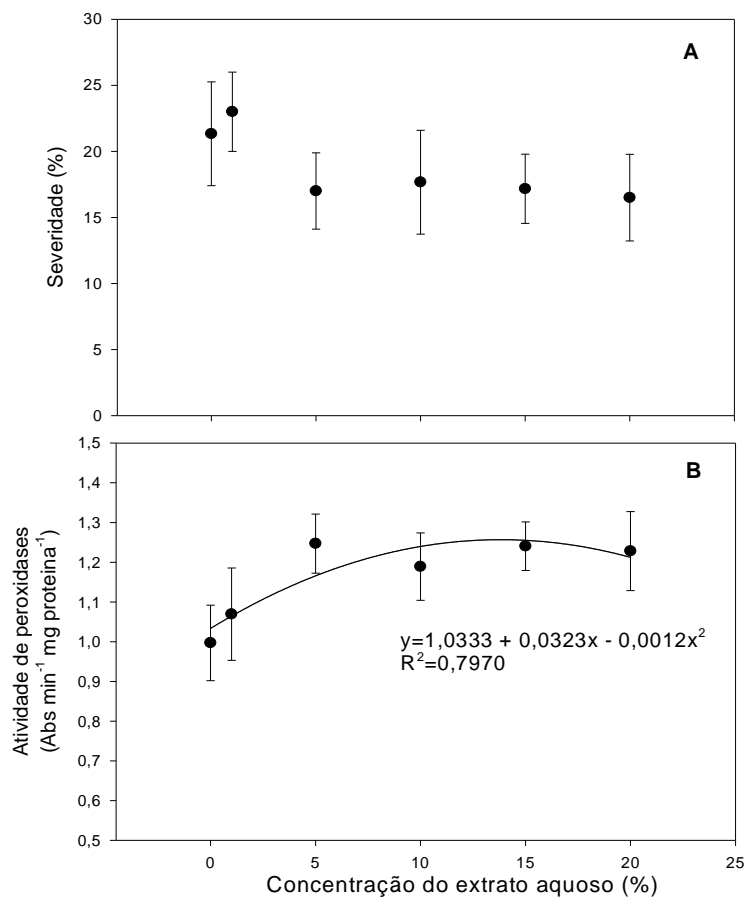


Figura 20. Severidade do crestamento bacteriano (A) e atividade de peroxidases (B) em plântulas de feijoeiro tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de *Corymbia citriodora*. Barras representam o erro padrão da média.

4.2.3 Efeito do número de aplicações do extrato aquoso em plântulas de pepino e feijão

O EA, quando aplicado duas vezes em cotilédones de pepino (uma três dias e outra seis dias antes da inoculação com o patógeno), promoveu redução significativa na severidade da antracnose com relação a apenas uma aplicação (três dias antes da inoculação). Esta redução na severidade da doença foi semelhante à obtida pelo ativador ASM aplicado três dias antes da inoculação. Para a enzima peroxidase, não houve diferença entre o número de aplicações, mas novamente duas aplicações permitiram resultados semelhantes ao ASM (Figura 21).

Em feijoeiro, não houve diferença significativa entre o número de aplicações do EA. Na severidade do crestamento bacteriano, apenas ASM reduziu

significativamente os sintomas da doença em relação à testemunha água. No entanto, para peroxidases, tanto ASM quanto o EA, em uma ou duas aplicações, induziram aumento na atividade enzimática, não diferindo entre si (Figura 22).

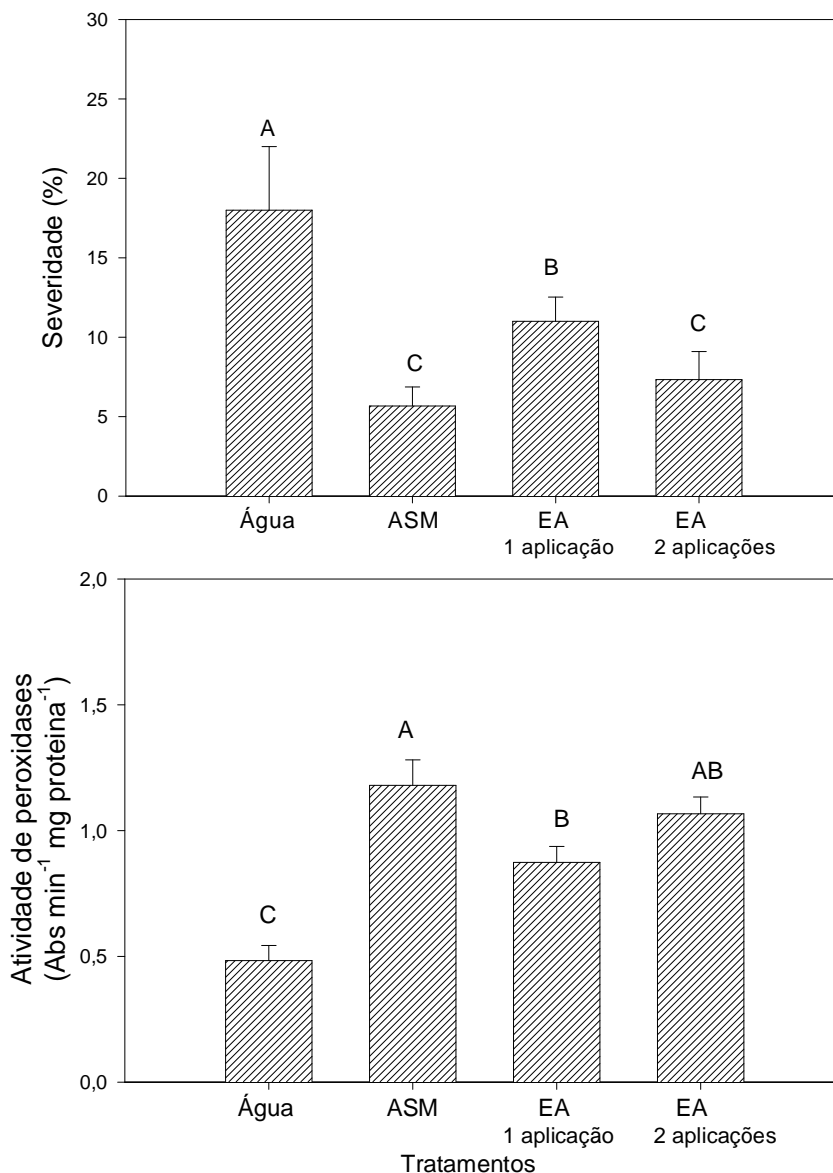


Figura 21. Severidade da antracnose e atividade de peroxidases em cotilédones de pepino tratados uma vez ou duas vezes (3 dias ou 3 e 6 dias antes da inoculação ou coleta de amostras, respectivamente) com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

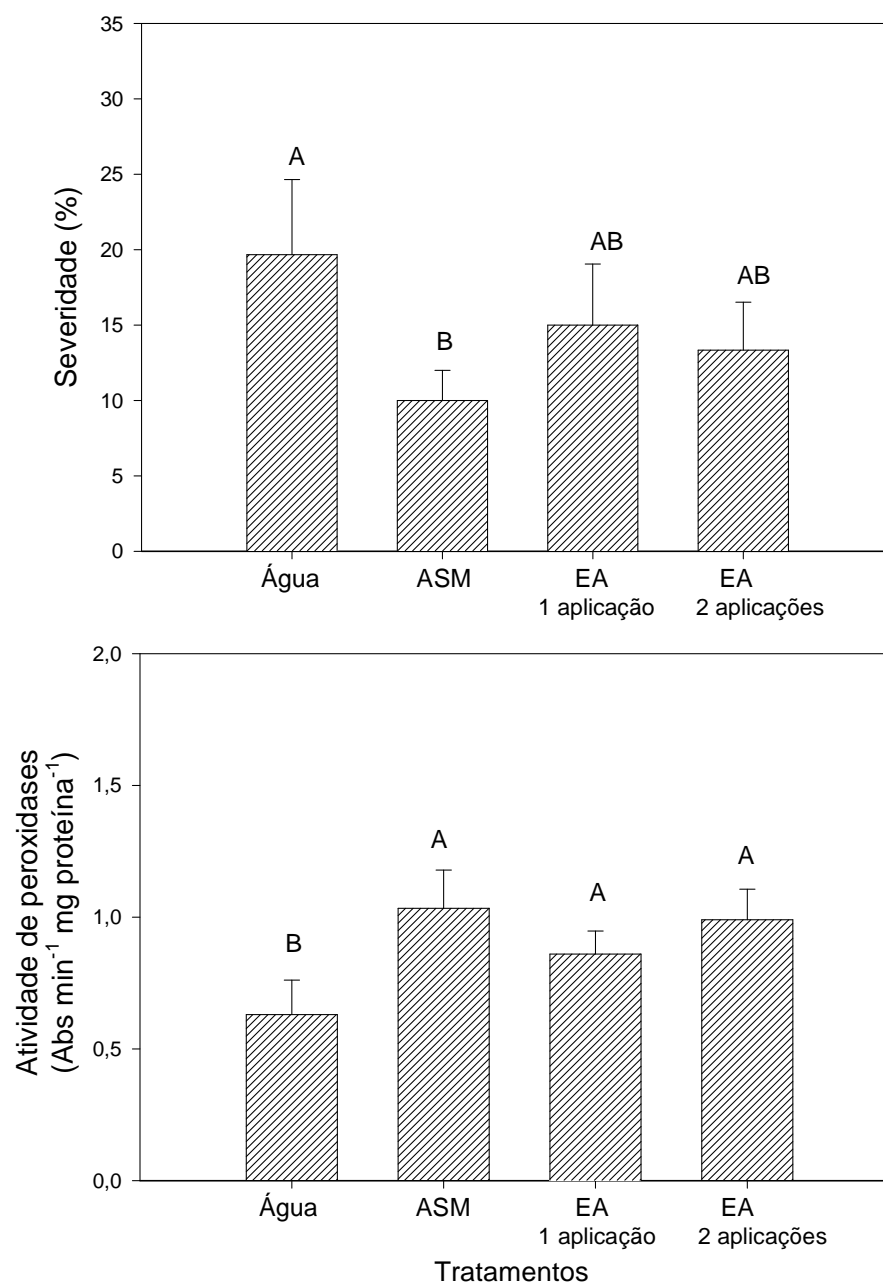


Figura 22. Severidade do crestamento bacteriano e atividade de peroxidases em plântulas de feijoeiro tratados uma vez ou duas vezes (3 dias ou 3 e 6 dias antes da inoculação ou coleta de amostras, respectivamente) com extrato aquoso (20%) de *Corymbia citriodora*. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Precipitação fracionada do extrato aquoso por sulfato de amônio

As frações obtidas pelas diferentes técnicas de fracionamento empregadas nesse trabalho foram testadas em bioensaios em cotilédones de pepino quanto a severidade da antracnose e atividade de peroxidases e β -1,3-glucanases, bem como em folhas de plântulas de feijoeiro quanto a severidade do cretamento bacteriano e atividade de peroxidases, além do potencial de indução de faseolina em hipocótilos de feijoeiro. No entanto, nenhuma das frações obtidas pela precipitação fracionada com sulfato de amônio promoveu efeito superior à testemunha água (Quadro 1). Esses resultados indicam o baixo efeito biológica das frações obtidas. Quanto ao efeito do extrato, este foi pertinente aos resultados obtidos anteriormente, com aumento nas variáveis mencionadas em relação à testemunha água, com exceção a severidade do cretamento bacteriano onde o EA não mostrou efeito significativo (Quadro 1 e 2).

Quadro 1. Atividades de peroxidases, β -1,3-glucanases e severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio

Tratamento	Proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aç. redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Peroxidases	β -1,3 glucanases	Severidade (%)
Água	-	-	1,2 b	0,31 b	27,3 b
EA	33,4	68,2	1,9 a	0,51 a	16,8 a
0-25%	19,8	7,6	1,4 ab	0,36 b	25,1 b
25-50%	32,9	9,1	1,3 b	0,33 b	22,5 b
50-75%	43,2	12,3	1,4 ab	0,36 b	26,3 b
75-100%	25,7	6,2	1,3 b	0,28 b	27,2 b
Sobrenadante	1,2	4,1	1,1 b	0,30 b	31,4 b
CV (%)			10,1	20,7	26,8

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores de peroxidases apresentados em unidades de absorvância a 470 nm min^{-1} mg proteína^{-1} e β -1,3 glucanases em equivalente mg glicose hora^{-1} mg proteína^{-1} . Testemunhas: água destilada e extrato aquoso a 20% (EA) de *C. citriodora*.

Quadro 2. Atividades de peroxidases, produção de faseolina e severidade do crestamento bacteriano em plântulas de feijoeiro tratadas com frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio

Tratamento	Proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aç. redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Peroxidasas	Faseolina (Abs 280 nm)	Severidade (%)
Água	-	-	0,9 b	0,42 b	22,3 a
EA	33,4	68,2	1,8 a	0,71 a	16,1 a
0-25%	19,8	7,6	1,1 b	0,37 b	20,1 a
25-50%	32,9	9,1	1,3 b	0,49 b	18,9 a
50-75%	43,2	12,3	1,3 b	0,48 b	17,4 a
75-100%	25,7	6,2	1,2 b	0,47 b	22,0 a
Sobrenadante	1,2	4,1	0,9 b	0,39 b	24,7 a
CV (%)			18,2	16,8	19,3

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores de peroxidases apresentados em unidades de absorbância a 470 nm min^{-1} mg proteína $^{-1}$. Testemunhas: água destilada e extrato aquoso a 20% (EA) de *C. citriodora*.

4.4 Cromatografia de troca iônica com tampão Tris-HCl

A cromatografia de troca iônica (CTI) utilizando o tampão Tris-HCl permitiu a obtenção de seis picos protéicos com aumento gradual na concentração de NaCl (Figura 23). Nesse caso, foram coletadas apenas as frações retidas à resina DEAE-Celulose. A CTI obteve baixa concentração de açúcares redutores com um pico distinto coincidente com o pico I protéico. No entanto, os picos obtidos dessa forma foram pouco distintos.

Quando o EA foi novamente submetido à cromatografia de troca iônica (CTI), utilizando o tampão Tris-HCl e o material adsorvido foi eluído com NaCl no mesmo tampão, em procedimento “step wise”, foi possível obter picos mais distintos, os quais foram empregados nos bioensaios em plântulas de pepino e feijão. Para açúcares redutores, foram obtidos dois picos que foram coincidentes com os picos protéicos I e II.

O pico I foi correspondente ao material não retido na resina DEAE-Celulose. Como essa resina é de troca aniônica, ficam ligadas as proteínas que apresentam carga líquida negativa. Dessa forma, o pico I corresponde as proteínas que apresentam carga líquida positiva nas condições do tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0.

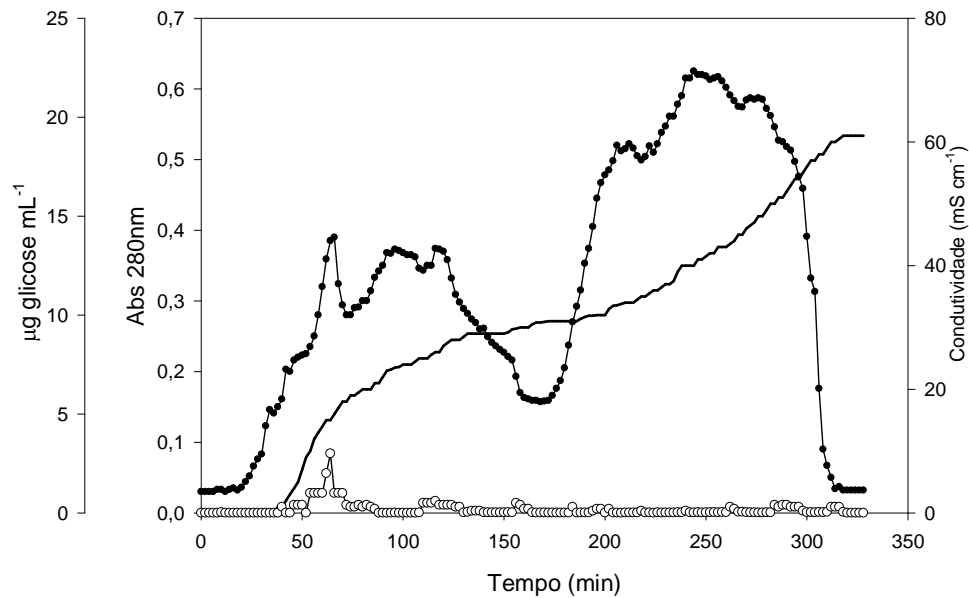


Figura 23. Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 à 1 M). Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (○) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (-) foram determinadas indiretamente por condutividade.

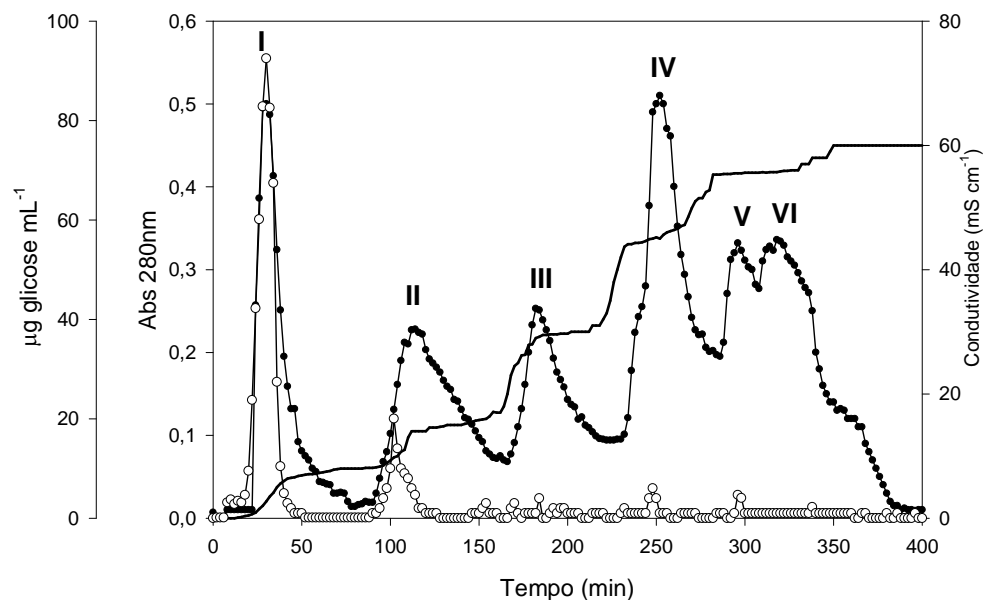


Figura 24. Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído com NaCl no mesmo tampão, em procedimento “step wise”. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (○) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (-) foram determinadas indiretamente por condutividade. Números romanos de I a VI indicam os picos protéicos.

4.5 Cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio

A CTI utilizando como tampão de eluição bicarbonato de amônio permitiu a obtenção de perfil semelhante ao Tris-HCl sendo possível a obtenção de seis picos pouco distintos de proteína (Figura 25). Nesse caso, foram coletadas apenas as frações retidas à resina DEAE-Cellulose.

Quando o EA foi novamente submetido a cromatografia de troca iônica (CTI), utilizando tampão de eluição bicarbonato de amônio e o material adsorvido foi eluído com NaCl no mesmo tampão, em procedimento “step wise”, foi possível obter picos mais distintos (Figura 26), os quais foram empregados nos bioensaios em plântulas de pepino e feijão. De maneira semelhante ao observado na CTI com Tris-HCl,

foram obtidos dois picos de açúcares redutores coincidentes com os picos protéicos I e II.

O pico I foi correspondente ao material não retido na resina DEAE-Celulose. Dessa forma, o pico I corresponde as proteínas que apresentam carga líquida positiva nas condições do tampão bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,0. As frações I e II são glicoprotéicas, pois os picos protéicos coincidem com picos de açúcares redutores.

Devido ao perfil de proteínas e açúcares redutores apresentarem picos mais distintos quando foi utilizado o procedimento “step wise”, tanto com emprego do tampão de eluição Tris-HCL como de bicarbonato de amônio, apenas os picos obtidos por esse procedimento foram testados em bioensaio em plântulas de pepino e feijão.

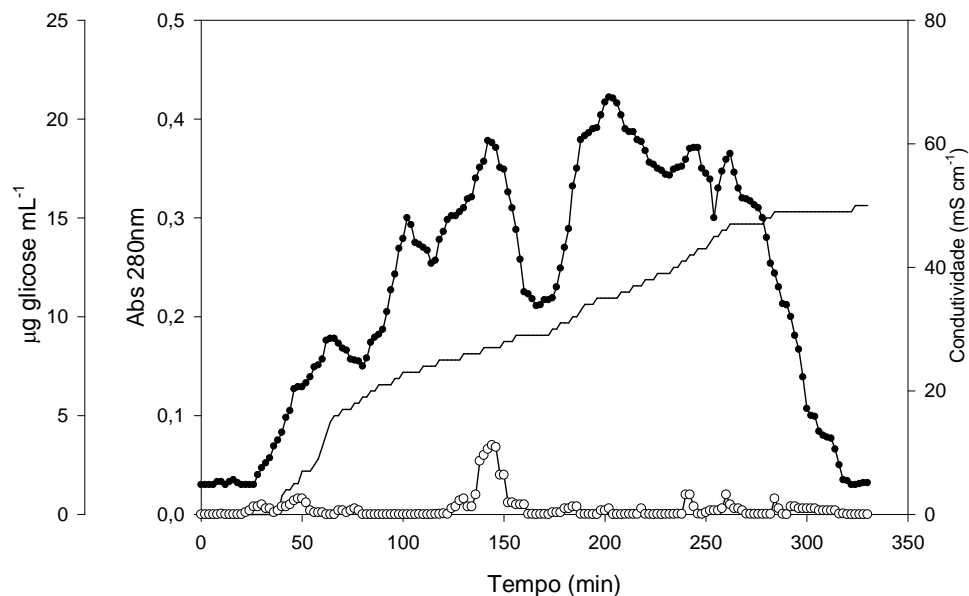


Figura 25. Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído com bicarbonato de amônio. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (○) pelo método de Lever (1972). Concentrações de bicarbonato de amônio (-) foram determinadas indiretamente por condutividade.

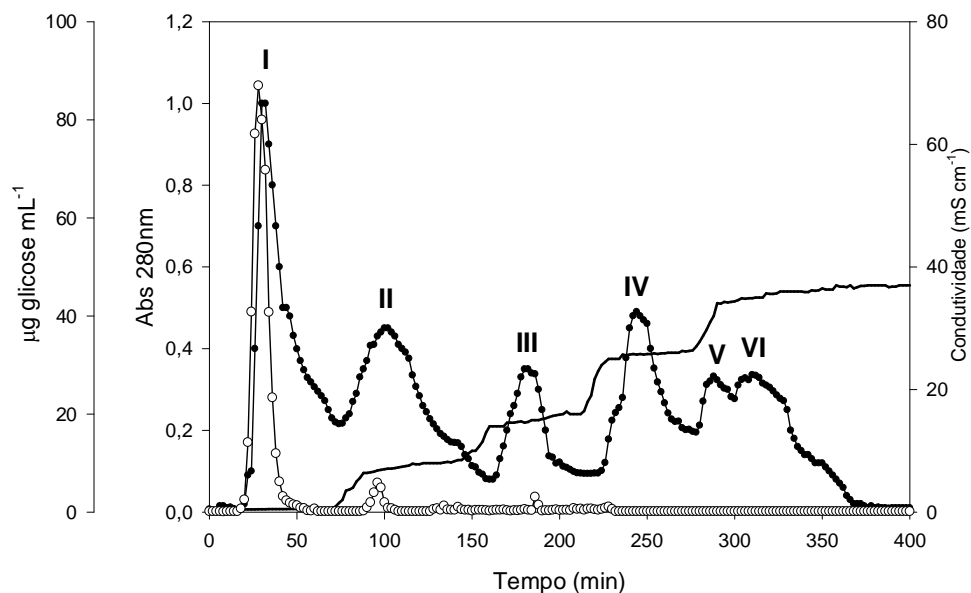


Figura 26. Cromatografia de troca iônica do EA de *Corymbia citriodora*. Uma amostra de 5 mL foi aplicada à resina (5 x 25 cm) de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,0. O material adsorvido foi eluído no mesmo tampão, em procedimento “step wise”. Frações de 5 mL foram coletadas. Proteína (●) foi determinada em 280 nm e carboidratos (○) pelo método de Lever (1972). Concentrações de bicarbonato de amônio (-) foram determinadas indiretamente por condutividade. Números romanos de I a VI indicam os picos protéicos.

No Quadro 3, são apresentados os resultados do conteúdo de proteínas e açúcares redutores presentes nas frações das CTIs e a respectiva atividade protetora nos cotilédones de pepino a *C. lagenarium* e respostas de atividade de peroxidases e β -1,3 glucanases como indicativo da atividade elicitora.

A CTI utilizando tampão bicarbonato de amônio permitiu maior recuperação de proteínas e carboidratos em relação ao tampão Tris-HCl. É possível que tenha ocorrido perda parcial desses componentes durante processo de diálise.

EA e ASM promoveram redução na severidade da antracnose em cotilédones de pepino e induziram aumento na atividade de peroxidases e β -1,3-glucanases, porém não foram obtidas frações que pudessem exercer atividade no controle da doença e indução nas enzimas de defesa de forma semelhante ao EA. Nenhuma das frações obtidas reduziu a severidade da antracnose em relação à testemunha água, porém as frações I, II e III, obtidas na CTI com bicarbonato de amônio manifestaram efeito intermediário na indução de peroxidases e β -1,3-glucanases.

No Quadro 4, são apresentados os resultados obtidos em folhas de feijoeiro pelo emprego das frações obtidas nas CTIs. Apenas ASM promoveu redução na severidade do crestamento bacteriano, não sendo observada nenhuma atividade nesse aspecto por parte das frações.

ASM induziu atividade de peroxidases em pepino, mas não de faseolina. Por outro lado, o EA induziu o acúmulo de fitoalexinas, mas foi inferior a ASM na indução de peroxidases. Esses resultados são pertinentes aos já relatados em bioensaios anteriores.

As frações I e II obtidas na CTI com tampão bicarbonato de amônio foram as únicas capazes de apresentar um efeito intermediário entre as testemunhas EA e água, porém não diferindo dessas na atividade de peroxidases e no conteúdo de faseolina.

Quadro 3. Atividades de peroxidases, β -1,3 glucanases e severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com os picos protéicos provenientes da cromatografia de troca iônica

Tratamento	Proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aç. redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Peroxidasas	β -1,3 glucanases	Severidade antracnose (%)
Água	-	-	1,20 d	0,45 c	23,5 c
ASM	-	-	2,99 a	0,78 a	8,3 a
EA	35,4	70,2	2,36 b	0,72 a	14,2 b
Tampão Tris-HCl					
T I	17,3	26,4	1,78 cd	0,47 c	19,2 c
T II	4,7	6,8	1,12 d	0,48 c	23,7 c
T III	3,4	7,2	0,95 d	0,39 c	26,8 c
T IV	7,4	2,9	1,29 d	0,44 c	21,4 c
T V	7,1	2,4	1,01 d	0,40 c	26,1 c
T VI	4,2	1,9	1,18 d	0,48 c	24,3 c
Tampão bicarbonato de amônio					
B I	19,8	27,7	2,02 c	0,66 b	19,9 c
B II	9,2	7,9	1,93 c	0,58 bc	18,7 c
B III	11,5	7,2	1,40 d	0,39 c	22,7 c
B IV	14,7	2,2	1,96 c	0,49 bc	18,3 c
B V	10,1	1,1	1,28 d	0,45 c	21,8 c
B VI	9,5	1,0	1,35 d	0,44 c	23,5 c
CV (%)			8,6	9,8	17,5

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. EA: extrato aquoso; T: Tampão Tris-HCl; B: Tampão bicarbonato de amônio. Valores de peroxidases apresentados em unidades de absorbância a 470 nm min^{-1} mg proteína^{-1} e β -1,3 glucanases em equivalente $\text{mg glicose hora}^{-1}$ mg proteína^{-1} .

Quadro 4. Atividades de peroxidases, faseolina e severidade do cretamento bacteriano em folhas de feijoeiro tratadas com os picos protéicos provenientes da cromatografia de troca iônica

Tratamento	Proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aç. redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Peroxidasas	Faseolina	Severidade (%)
Água	-	-	1,42 c	0,37 b	19,1 b
ASM	-	-	2,68 a	0,39 b	10,2 a
EA	35,4	70,2	2,17 b	0,61 a	14,9 ab
Tampão Tris-HCl					
T I	17,3	26,4	1,59 c	0,45 b	17,3 b
T II	4,7	6,8	1,30 c	0,33 b	22,1 b
T III	3,4	7,2	1,37 c	0,36 b	19,0 b
T IV	7,4	2,9	1,41 c	0,41 b	18,7 b
T V	7,1	2,4	1,29 c	0,43 b	23,3 b
T VI	4,2	1,9	1,25 c	0,39 b	20,1 b
Tampão bicarbonato de amônio					
B I	19,8	27,7	2,07 bc	0,52 ab	16,5 b
B II	9,2	7,9	2,02 bc	0,49 ab	15,9 b
B III	11,5	7,2	1,34 c	0,41 b	21,2 b
B IV	14,7	2,2	1,63 c	0,36 b	17,8 b
B V	10,1	1,1	1,33 c	0,42 b	19,4 b
B VI	9,5	1,0	1,40 c	0,35 b	21,7 b
CV (%)			9,0	11,8	20,3

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. EA: extrato aquoso; T: Tampão Tris-HCl; B: Tampão bicarbonato de amônio. Valores de peroxidases apresentados em unidades de absorvância a 470 nm min^{-1} mg proteína $^{-1}$.

4.6 Cromatografia de filtração em gel (CFG)

As frações I, II e IV obtidas na CTI com tampão bicarbonato de amônio foram as únicas que apresentaram alguma atividade em pepino ou feijão. Assim estas foram selecionadas e submetidas à CFG.

Não foi possível o fracionamento da fração I na CFG, sendo obtido apenas um grande pico glicoprotéico (Figura 27), apresentando uma massa molecular relativa em torno de 1,2 kDa (Quadro 5).

A partir da fração II, foram obtidos dois picos próximos, sendo o primeiro glicoprotéico (Figura 28). Estes picos apresentaram massa molecular relativa de 5,8 e 1,9 kDa, respectivamente.

A fração IV permitiu maior fracionamento, sendo obtidos quatro picos protéicos (Figura 29), apresentando massa molecular relativa de 14,2, 3,0, 1,0 e 0,1 kDa.

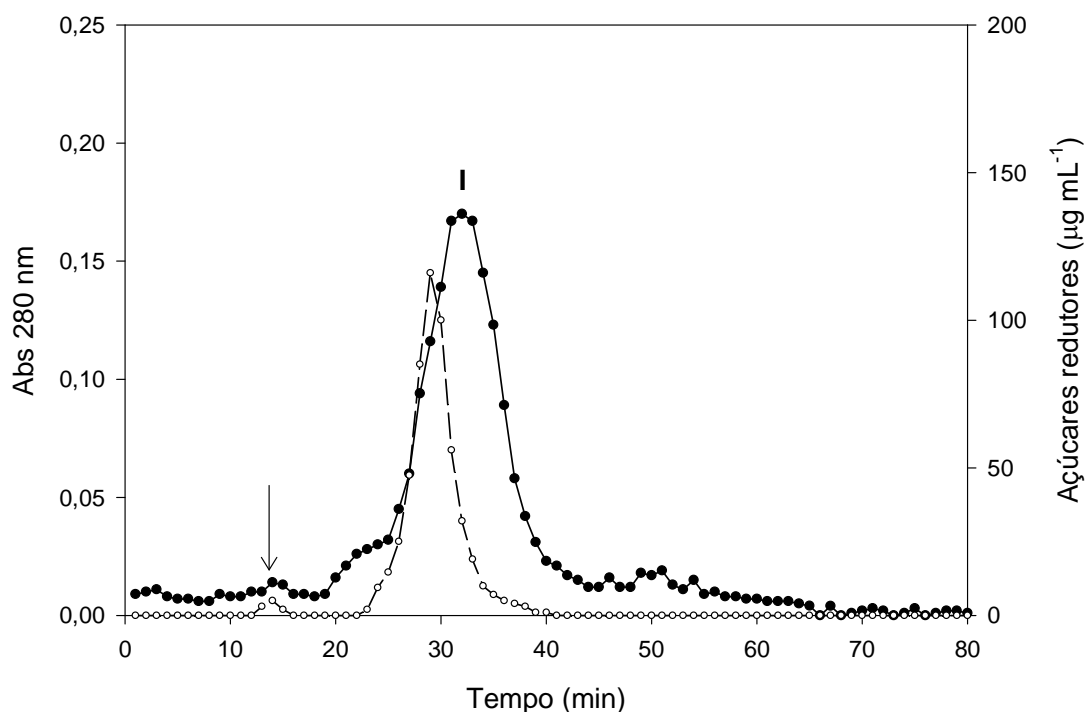


Figura 27. Cromatografia de filtração em gel da fração I da cromatografia de troca iônica adsorvida em DEAE-Celulose e eluída com tampão bicarbonato de amônio. Frações coletadas de 1 mL em fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ eluídas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Seta indica o V_0 (“void volume”). I: indica o pico protéico. Conteúdo de proteínas (●) e de açúcares redutores (○).

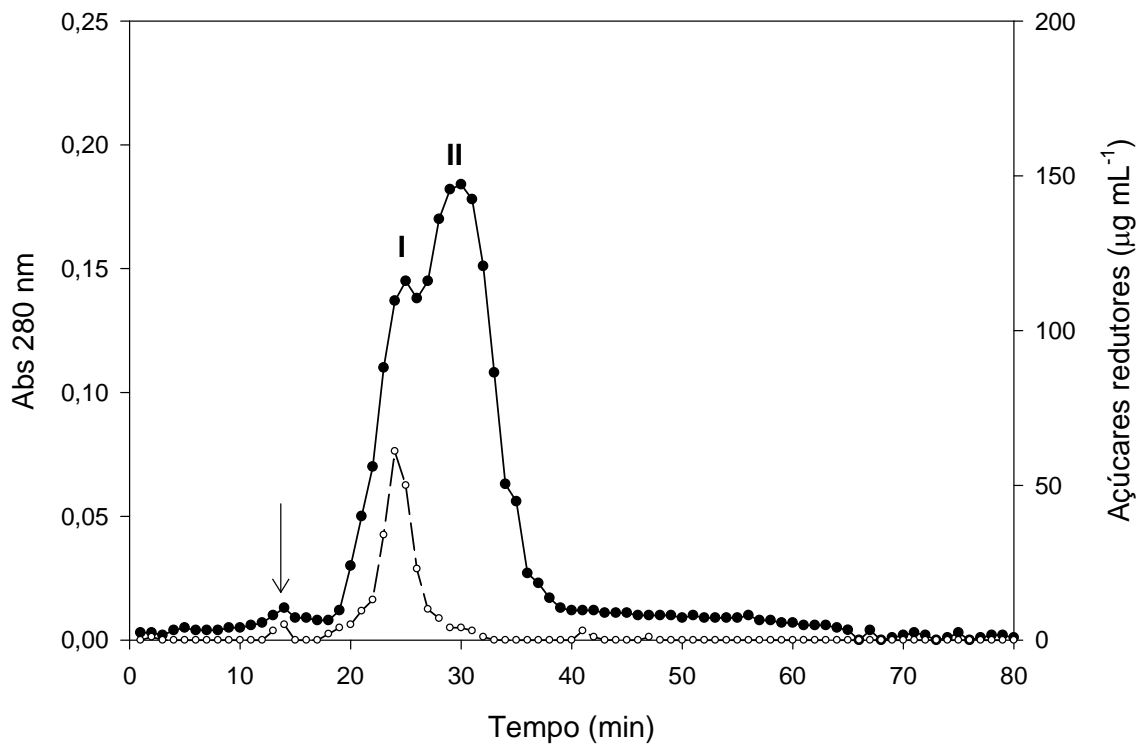


Figura 28. Cromatografia de filtração em gel da fração II da cromatografia de troca iônica adsorvida em DEAE-Celulose e eluída com tampão bicarbonato de amônio. Frações coletadas de 1 mL em fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ eluídas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Seta indica o V_0 ("void volume"). Conteúdo de proteínas monitorado pela absorvância a 280 nm. Números romanos de I e II indicam os picos protéicos. Conteúdo de proteínas (●) e de açúcares redutores (○).

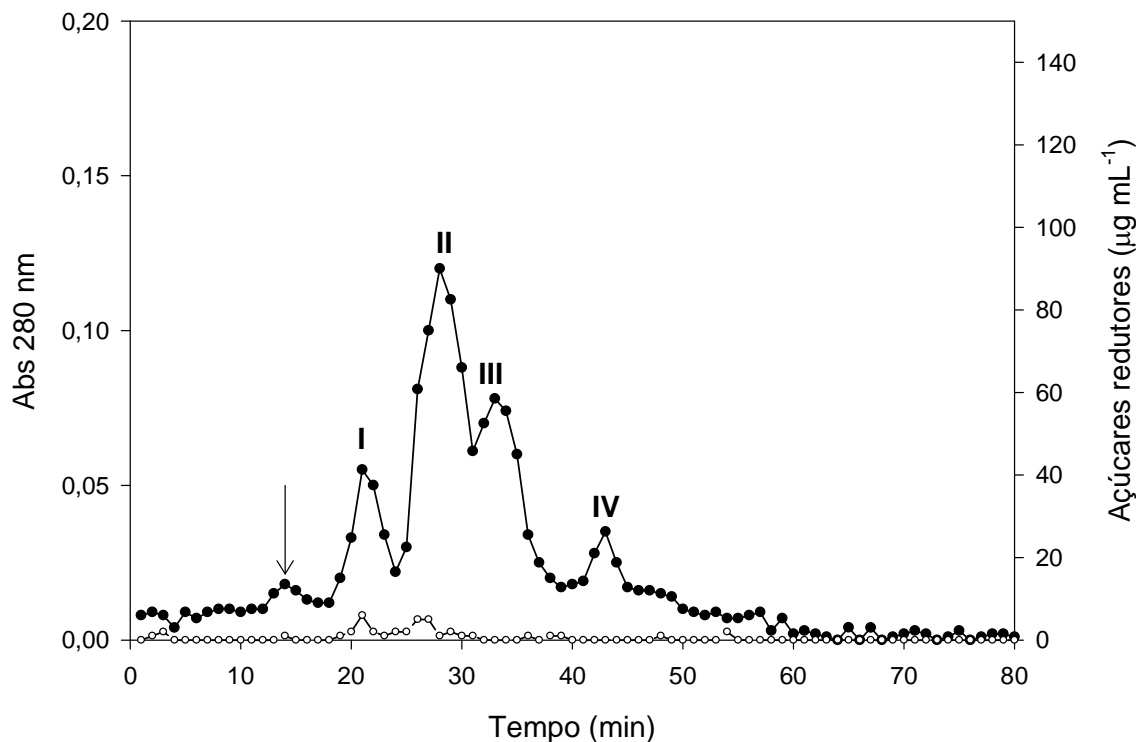


Figura 29. Cromatografia de filtração em gel da fração IV da cromatografia de troca iônica adsorvida em DEAE-Celulose e eluída com tampão bicarbonato de amônio. Frações coletadas de 1 mL em fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ eluídas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Seta indica o V_0 (“void volume”). Conteúdo de proteínas monitorado pela absorvância a 280 nm. Números romanos de I a IV indicam os picos protéicos. Conteúdo de proteínas (●) e de açúcares redutores (○).

Nenhuma das frações obtidas na CFG apresentou efeito sobre a severidade da antracnose ou β -1,3-glucanases em pepino (Quadro 5). Sobre a atividade de peroxidases, apenas o único pico apresentado pela fração I da CTI mostrou atividade superior à testemunha representada pelo tampão fosfato de sódio, no entanto, sua atividade foi inferior ao EA.

Em feijoeiro as frações da CFG também se mostraram ineficientes, sendo que nenhuma das frações obtidas apresentou atividade superior à testemunha tampão. Apenas o único pico apresentado pela fração I da CTI mostrou atividade semelhante ao EA na indução de faseolina.

Diante desses resultados, as frações I, II e IV, obtidas inicialmente na CTI e que mostraram melhor efeito, foram selecionadas para avaliação da estabilidade térmica e digestibilidade enzimática pelo tratamento com proteínase.

Quadro 5. Massa molecular relativa (Mm) e atividades de peroxidases, β -1,3 glucanases e severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com os picos protéicos provenientes da cromatografia de filtração em gel

Frações da CTI	Frações da CFG	Mm (kDa)	Peroxidases	β -1,3-glucanases	Severidade (%)
I	I	1,2	1,28 b	1,26 b	19,3 b
II	I	5,8	0,79 c	0,96 b	25,1 b
	II	1,9	0,80 c	1,07 b	22,8 b
IV	I	14,2	0,94 c	1,23 b	21,3 b
	II	3,0	1,17 bc	1,27 ab	19,8 b
	III	1,0	0,84 c	1,20 b	22,1 b
	IV	0,1	0,86 c	0,96 b	26,2 b
EA	-	-	1,51 a	1,57 a	15,4 a
Tampão	-	-	0,80 c	0,99 b	23,0 b
CV (%)			9,4	14,8	23,9

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Testemunha representada por tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Valores de peroxidases apresentados em unidades de absorvância a 470 nm $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ e β -1,3 glucanases em equivalente $\text{mg glicose hora}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

Quadro 6. Massa molecular relativa (Mm) e atividades de peroxidases, faseolina e severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas de feijoeiro tratadas com os picos protéicos provenientes da cromatografia de filtração em gel

Frações da CTI	Frações da CFG	Mm (kDa)	Peroxidases	Faseolina (abs 280 nm)	Severidade (%)
I	I	1,2	1,41 b	0,45 ab	25,2 a
II	I	5,8	0,96 b	0,40 b	28,4 a
	II	1,9	1,44 b	0,42 b	23,9 a
IV	I	14,2	0,97 b	0,33 b	29,3 a
	II	3,0	1,22 b	0,40 b	24,2 a
	II	1,0	1,20 b	0,28 b	24,0 a
	IV	0,1	0,98 b	0,37 b	30,3 a
EA	-	-	1,73 a	0,57 a	20,1 a
Tampão	-	-	1,18 b	0,32 b	27,1 a
CV (%)	-	-	8,8	10,5	26,1

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Testemunha representada por tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Valores de peroxidases apresentados em unidades de absorbância a 470 nm mg proteína⁻¹ min⁻¹.

4.7 Caracterização parcial das frações ativas

O EA, também nesse bioensaio, reduziu significativamente a severidade da antracnose em cotilédones de pepino (Figura 30). Essa redução foi de 34,7% quando comparado a testemunha água. No entanto, as frações I, II e IV obtidas na CTI não diferiram entre si e da testemunha água quando submetidas ou não ao tratamento térmico e a digestibilidade enzimática com proteínase.

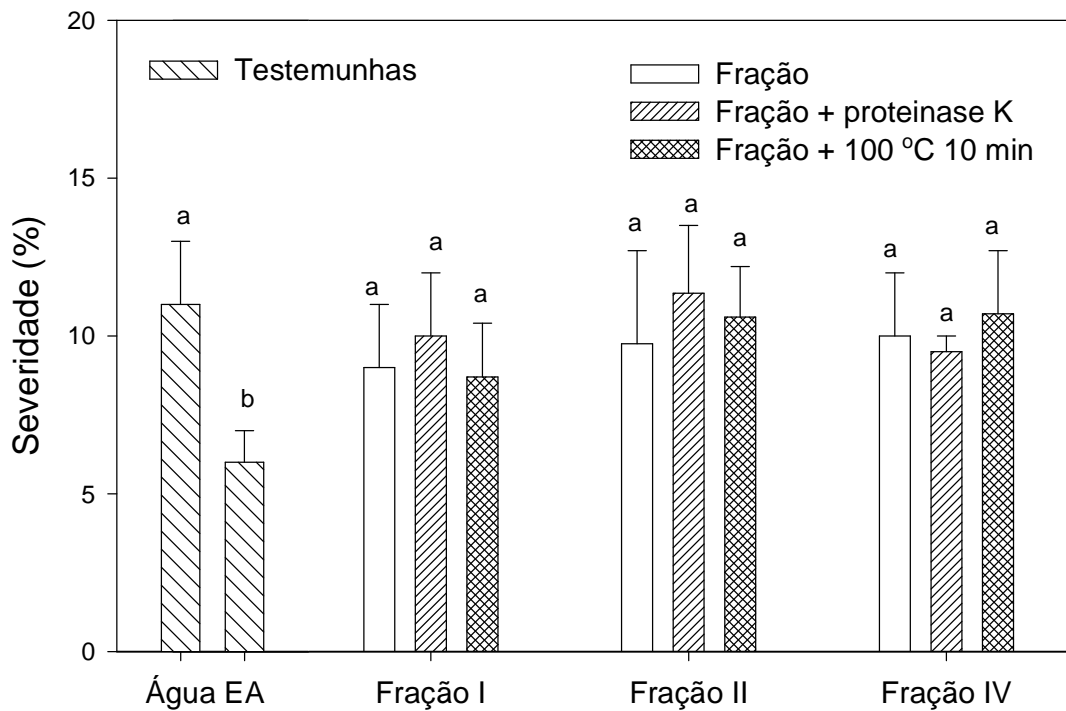


Figura 30. Severidade da antracnose em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na atividade de peroxidases em pepino, as frações I, II e IV apresentaram atividade intermediária entre as testemunhas água e EA (Figura 31). Quando submetidas ao tratamento com proteinase, a fração I teve a sua atividade reduzida, não diferindo da testemunha água, que indica que a presença de proteínas é necessária para o efeito dessa fração. Quando essa fração foi submetida ao tratamento térmico, a atividade se manteve semelhante à fração não tratada, indicando atividade termoestável. As demais frações não tiveram suas atividades alteradas significativamente em função dos tratamentos.

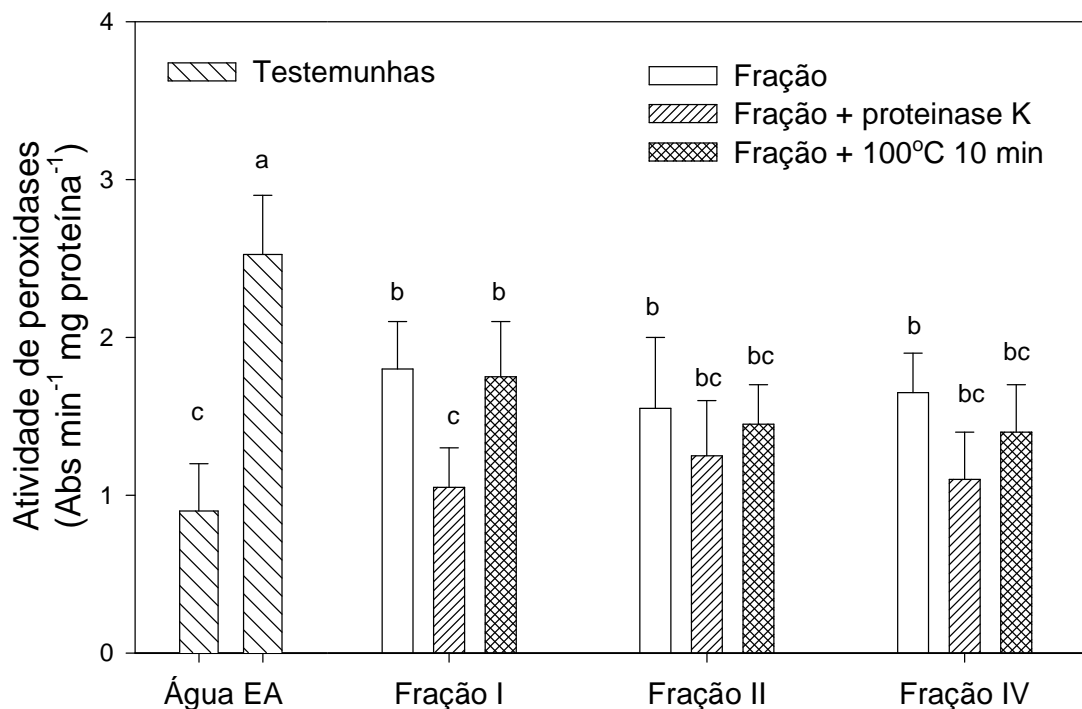


Figura 31. Atividade de peroxidases em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteinase K. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade de β -1,3-glucanases em cotilédones de pepino foi apenas induzida pelo EA (Figura 32). Nenhuma das frações, submetidas ou não aos tratamentos, apresentou diferença significativa entre si ou em relação a testemunha água.

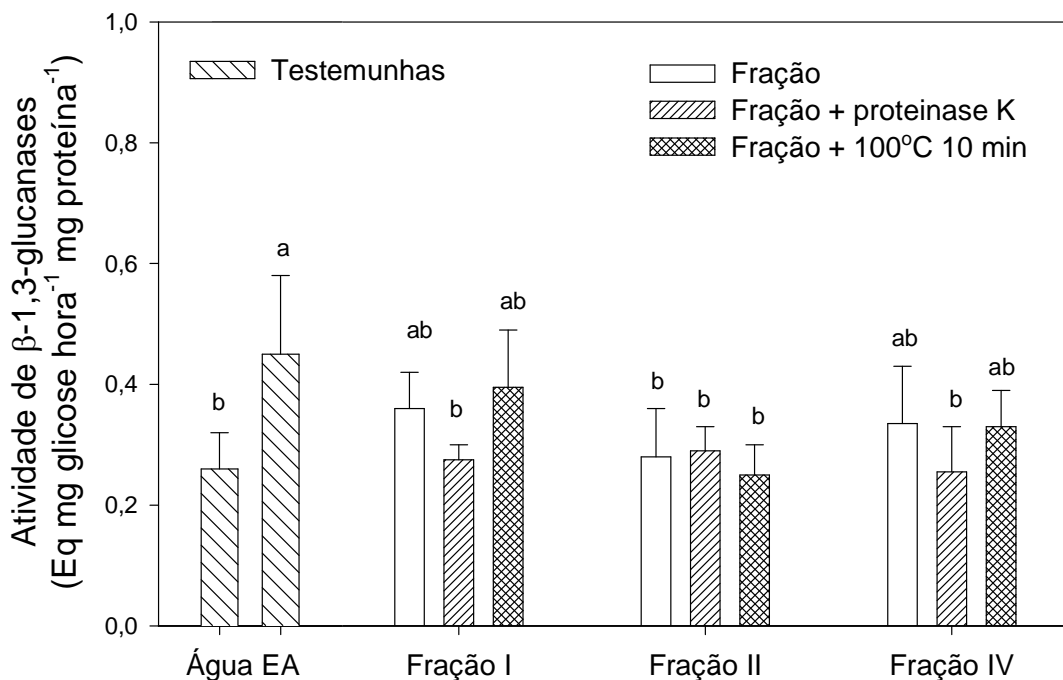


Figura 32. Atividade de β -1,3-glucanases em cotilédones de pepino tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteína. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em folhas de feijoeiro, não foi observada diferença significativa entre as frações, independentemente do tratamento térmico e com a proteínase, sobre a severidade do crestamento bacteriano (Figura 33). Nem mesmo o EA foi eficiente em reduzir significativamente a severidade da doença.

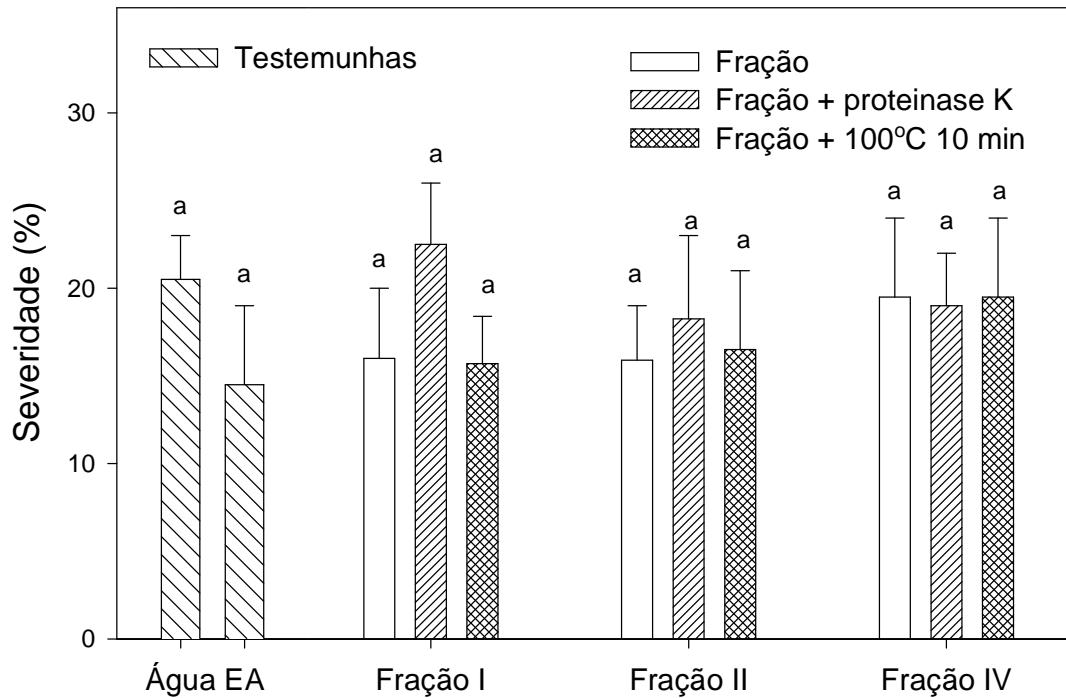


Figura 33. Severidade do crestamento bacteriano comum em plântulas de feijoeiro tratados com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteínase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade de peroxidases em feijoeiro foi apenas induzida pelo EA (Figura 34). Nenhuma das frações, submetidas ou não aos tratamentos apresentou diferença significativa entre si ou em relação à testemunha água.

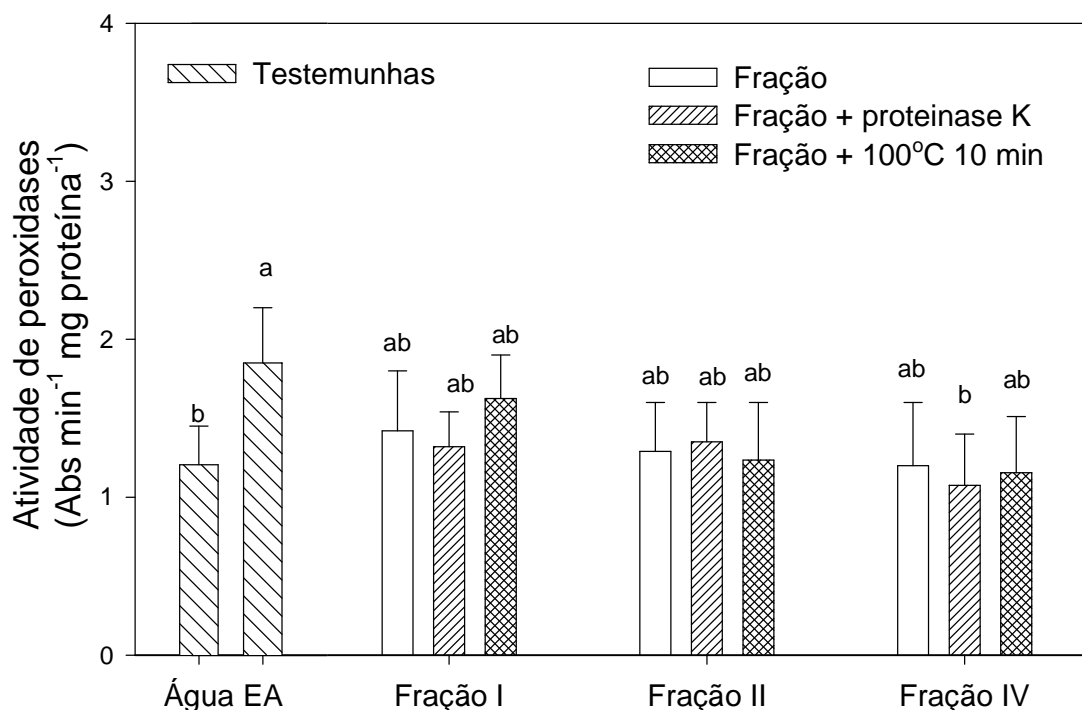


Figura 34. Atividade de peroxidases em plântulas de feijoeiro tratadas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteína. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação ao acúmulo da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro, o EA mostrou-se novamente bom indutor, com aumento de 47,3% em relação à testemunha água. Quando submetidas ao tratamento com proteinase K a fração I teve a sua atividade reduzida, não diferindo da testemunha água, indicando que a presença de proteínas é necessária para o efeito dessa fração. Quando essa fração foi submetida ao tratamento térmico, a atividade se manteve semelhante à fração não tratada, indicando atividade termoestável. As frações I e II mostraram atividade intermediária, enquanto que a fração IV não induziu faseolina. Para as frações II e IV, os tratamentos térmicos e com proteinase não provocaram alteração na atividade das respectivas frações.

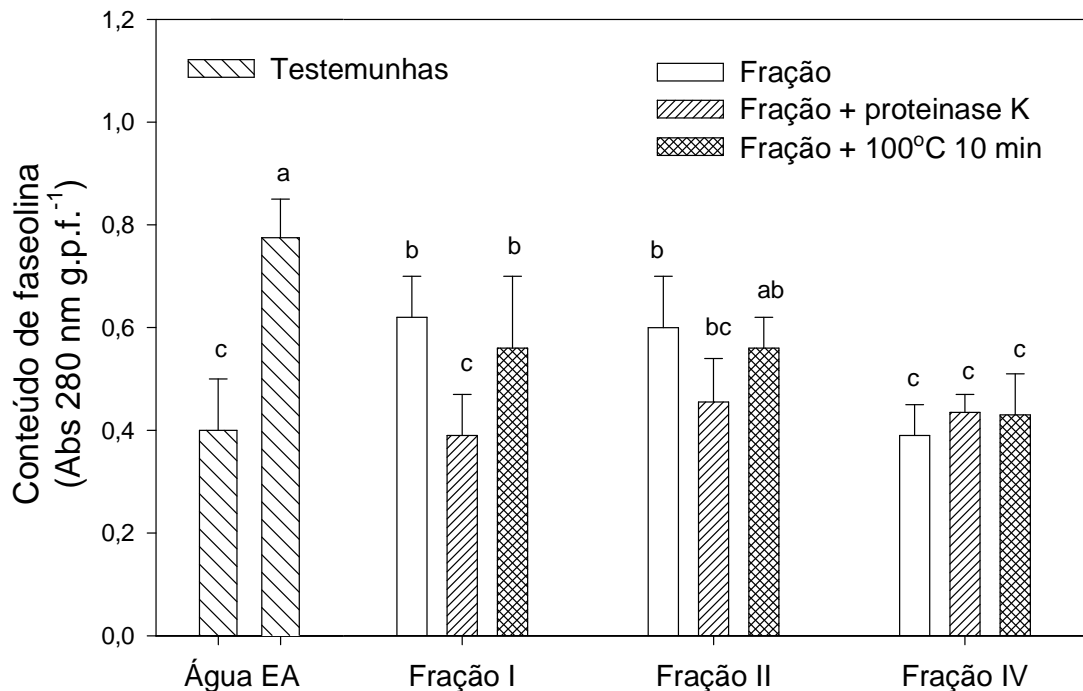


Figura 35. Acúmulo de faseolina em plântulas de feijoeiro tratadas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica com tampão bicarbonato de amônio submetidas ou não ao tratamento térmico a 100°C por 10 minutos ou com proteinase. Constituíram testemunhas água destilada e extrato aquoso (20%) (EA) de *Corymbia citriodora*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeito da curva de autoclavagem na atividade do extrato e conteúdo de proteínas e açúcares redutores

A autoclavagem pode provocar drásticas alterações nas substâncias que são submetidas a esse procedimento. Além da esterilização, o elevado aquecimento sob pressão pode provocar alterações em seus constituintes. São numerosos os trabalhos que relatam alteração no conteúdo de proteínas ou carboidratos, ou então alteração na atividade biológica de um preparado elicitor.

Se por um lado a autoclavagem pode degradar compostos ativos resultando em perda de atividade, este processo pode contribuir para solubilidade de proteínas ou outros compostos presentes em um extrato.

Considerando o efeito da autoclavagem no aumento na solubilidade de compostos, esse processo tem sido utilizado para extração de elicitores a partir da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LABANCA, 2002).

Nesse sentido, Bonaldo (2005) escolheu o tempo de autoclavagem de quatro horas para realizar o fracionamento de elicitores a partir de *S. cerevisiae*, por esse tempo ter promovido maior acúmulo de carboidratos, podendo ser indicativo de concentrações mais altas de compostos elicitores.

Da mesma forma que a autoclavagem pode afetar a atividade indutora de respostas de defesa na planta, pode também afetar drasticamente a atividade antimicrobiana direta do extrato sobre o patógeno, sugerindo a presença de compostos termolábeis (FRANZENER et al., 2003).

Nesse trabalho, foram observadas poucas alterações no conteúdo de proteínas e açúcares redutores no EA em função da autoclavagem. De forma semelhante, a atividade biológica do extrato, tanto na cultura de pepino como em feijão, foi pouco comprometida, mas houve tendência de redução nessa atividade nos maiores tempos de autoclavagem sequencial. Estes resultados sugerem a degradação parcial de compostos ativos durante sucessivas autoclavagens.

Diante desses resultados, foi escolhido o EA sem autoclavagem para estudo do potencial de indução de enzimas relacionadas à defesa, bem como fracionamento e caracterização de frações ativas.

5.2 Atividade protetora e indutora de enzimas de defesa pelo EA em pepino e feijão

Ao realizar a caracterização parcial da atividade indutora de resistência de uma substância se faz necessário procurar esclarecer quais os principais mecanismos de ação e efeito do objeto de estudo. Nesse caso, o EA foi avaliado quanto sua capacidade em controlar a antracnose em pepino e o crestamento bacteriano em feijão. Além disso, foi avaliado seu potencial em ativar diferentes enzimas de defesa nessas espécies vegetais. O EA foi obtido após centrifugação a 20.000 *g* e filtragem em membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro (Millipore). Quando o extrato bruto aquoso é apenas filtrado em papel de filtro quantitativo, ele pode conter compostos e materiais que não estão completamente solúveis, tais como micro fragmentos de tecido vegetal ou mesmo alguns compostos fenólicos não solúveis em água (TAIZ & ZEIGER, 2009), mas que se mantêm em suspensão quando o material é agitado. É comum em bioensaios ou mesmo em aplicações a campo a utilização de extratos aquosos nessa forma. Quando o extrato é centrifugado sob alta rotação é formado um considerável precipitado. Este precipitado foi ressuspenso em água e imediatamente utilizado como tratamento nos bioensaios para avaliar a possível presença de elicitores nessa porção. O sobrenadante foi considerado como extrato aquoso (EA). É importante considerar que a centrifugação a 20.000 ou 15.000*g* é comumente utilizada em análise de proteínas e carboidratos presentes nos tecidos vegetais, uma vez que essa porção, a princípio, estará solúvel no sobrenadante, juntamente com outros compostos solúveis em água.

O EA reduziu significativamente a severidade da antracnose em pepino, mas não promoveu redução significativa na severidade do crestamento bacteriano. No entanto, o EA induziu significativamente a atividade de peroxidases tanto em pepino como em feijão.

Alguns autores consideram o acúmulo de peroxidases como um marcador bioquímico da resistência induzida em pepino (CONTI et al., 1994). No entanto, a correlação entre a atividade dessas enzimas e a proteção das plantas nem sempre é evidente (SCHNEIDER & ULLRICH, 1994). Dalisay e Kuc (1995) demonstraram que as peroxidases não têm relação direta com a indução de resistência em pepino e, portanto, não poderiam ser usadas como um marcador de resistência nesse patossistema conforme sugerido por outros autores. Diante do comprovado papel das peroxidases em mecanismos de defesa, como a formação da lignina pela polimerização de fenilpropanóides, é esperado que alterações na atividade de peroxidases envolvam também alteração na atividade de outras enzimas presentes na mesma rota metabólica. Assim, conforme sugerido por Boava et al. (2010), as peroxidases podem ser usadas em estudos de indução de resistência, não como um marcador, mas sim como uma das muitas respostas de defesa manifestadas pelas plantas.

Os trabalhos de Hammerschmidt e Kuc (1982), Conti et al. (1994), entre outros, mostraram que agentes indutores de resistência em pepino provocam rápida lignificação da parede de células epidermais do hospedeiro que venham a entrar em contato com o fitopatógeno, o que está associado a aumentos na atividade de peroxidases, de forma que essas enzimas são apontadas, em muitos casos, como um marcador bioquímico da resistência induzida nessa espécie vegetal. Em plantas de feijão, Sbalcheiro; Denardin e Brammer (2009) também observaram aumento na atividade de peroxidases e redução na severidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em função do tratamento com biocontrolador (*Bacillus* sp.) tanto aplicado via semente bem como por aspersão na parte aérea.

As peroxidases participam de vários processos fisiológicos relacionados à defesa como ligação cruzada de proteínas de parede celular, de pectinas por pontes diferulícos e a oxidação de álcoois fenólicos durante a formação de lignina. As isoenzimas de peroxidase estão presentes em numerosos compartimentos celulares (retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndria, citosol, vacúolos) e na parede celular. Na parede celular, as peroxidases podem estar presentes em forma solúvel, iônica ou covalentemente ligadas. O fortalecimento da parede celular, uma das funções mais importantes da peroxidase, tem sido atribuído principalmente a

peroxidases cuja atividade pode ser detectada pelo uso de siringaldazina como substrato na mistura de reação dos testes enzimáticos (RANIERI et al., 2001). As peroxidases ainda são capazes de catalizar a incorporação de glicoproteínas à parede celular, a destruição peroxidativa do ácido indolacético e de outros reguladores de crescimento. Assim, em função de sua participação na síntese de lignina e oxidação de compostos fenólicos, a peroxidase pode contribuir na resistência das plantas contra fitopatógenos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Campos et al. (2004) observaram acréscimos nas atividades de polifenoloxidase em plantas de feijão previamente tratadas com ácido salicílico e com a raça delta de *C. lindemuthianum* e inoculadas com o patótipo virulento de *C. lindemuthianum* após três dias do tratamento indutor. Silva et al. (2009b), avaliando sementes de feijoeiro microbiolizadas com *Pseudomonas* fluorescentes, obtiveram alterações metabólicas em folhas de feijoeiro com aumento no conteúdo de proteínas solúveis totais e da atividade de polifenoloxidase.

Nenhum dos tratamentos induziu a atividade de quitinases, porém em pepino o EA e ASM induziram β -1,3-glucanases. Di Piero (2003), estudando o potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na indução de resistência em pepino, não obteve indução na atividade de β -1,3-glucanases. No entanto, Ji e Kuc (1995) mostraram que uma forma isoforma acídica de β -1,3-glucanase participa da resistência em pepino. Borsato; Di Piero e Stadinik (2010) verificaram redução no diâmetro das pústulas de *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro e aumento na atividade de β -1,3-glucanases na cultivar Pérola, 48 horas após a inoculação, pelo tratamento com o polissacarídeo ulvana realizado seis e três dias antes da inoculação. Segundo Buzi et al. (2004), a expressão da resistência em melão à *Didymella bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum* pelo tratamento de sementes com acibenzolar-S-methyl se deve ao incremento da atividade da enzima quitinase, a qual por uma ação direta, hidrolisa a quitina presente na parede celular dos fungos.

A presença de um patógeno induz a produção de várias quitinases, diferindo na localização, na atividade, propriedade da ligação com a quitina e mecanismo catalítico. O tipo de quitinase produzido durante a indução de resistência está

intimamente relacionado ao estímulo indutor ao qual a planta é submetida (KASPRZEWSKA, 2003).

Quanto a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), não foi observada indução em feijoeiro, mas em pepino houve pequena atividade pelo EA e ASM que foi de 18,5 e 16,2%. Kuhn (2007) observou que, em feijoeiros tratados com *Bacillus cereus* e ASM, a atividade da FAL não foi alterada em função dos indutores. Isso pode significar que a rota dos fenilpropanóides não sofreu alterações, como por exemplo, os mecanismos de síntese de lignina, compostos fenólicos, quinonas, entre outros. Faulin (2010) observou que plantas de feijoeiro tratadas com ASM tiveram aumentados seus teores de fenóis, proteínas totais e peroxidases, sugerindo que houve indução de resistência nas plantas em função da aplicação do ASM, visto que a severidade da doença diminuiu.

O aumento da FAL foi relacionado com a redução na severidade da mancha bacteriana em arroz, através da indução de resistência por *Pseudomonas fluorescens* (VIDHYASEKARAM et al., 2001). O mesmo não foi observado por Silva et al. (2004), que não detectaram alterações na atividade de FAL no tratamento de sementes com *Bacillus cereus* em tomateiro, no entanto, ressaltaram elevada atividade de peroxidases. Peng et al. (2004) observaram aumento de sete vezes na atividade de FAL em pepino 48 após ser induzida com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum*. Gális; Smith e Jamenson (2004) induziram resistência em feijoeiro e observaram redução na multiplicação do vírus do mosaico branco do trevo (WCIMV), bem como aumento na expressão da FAL. Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares de feijoeiro com ácido salicílico (AS) e um isolado de *C. lindemuthianum* avirulento e observaram que o fungo e o AS induziram a atividade de FAL, mas a magnitude dessa atividade variou em função do cultivar utilizado.

No presente trabalho, resultados expressivos foram obtidos pelo ativador de plantas que reduziu a severidade da antracnose e do crestamento bacteriano em pepino e feijão, respectivamente, bem como induziu nessas plantas as atividades de enzimas relacionadas à defesa.

A eficiência do uso do indutor ASM também tem sido descrita por vários autores para inúmeros patossistemas, sendo verificadas eficiências distintas

conforme o patossistema estudado. Embora a indução de resistência possa apresentar um amplo espectro de ação, raramente promove controle completo da doença, cuja redução na infecção do patógeno comumente fica em torno de 20 a 85% (WALTERS, 2009).

Resultados contrários foram obtidos por Soares e Maringoni (2002) ao estudarem a aplicação de ASM em tratamento foliar ou de sementes contra *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, agente causal da murcha de curtobacterium, onde não foi observada proteção. Fato semelhante foi observado no trabalho de Soares, Maringoni e Lima (2004) estudando diferentes cultivares de feijoeiro inoculadas com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Vigo-Schultz (2008) obteve aumento no conteúdo de polifenoloxidasas e peroxidases em plantas de feijão-vagem, cultivar Bragança, pelo tratamento com tintura etanólica de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp., *Hedera helix* e também pelo ativador de plantas acibenzolar-S-metil sugerindo seu envolvimento nos mecanismos de indução de resistência ao crescimento bacteriano comum, embora apenas tintura de *L. alba* e ASM reduziram de forma expressiva a área abaixo da curva de progresso da doença.

Cools e Ishii (2002) demonstraram que, quando plantas de pepino foram induzidas com ASM, as mesmas expressavam genes de peroxidase e de proteínas-RP e que, quando as plantas também eram desafiadas com o patógeno *Colletotrichum orbiculare*, havia aumento nas atividades de peroxidase e proteínas-RP em relação às plantas não tratadas e inoculadas. Bokshi; Morris e Deverall (2003) observaram aumento de β -1,3-glucanases em batata induzida com ASM, correlacionado com aumento da resistência contra *Fusarium semitectum*. Buzi et al. (2004), trabalhando com meloeiro, observaram aumentos na atividade de peroxidase e quitinase correlacionados com o aumento na resistência a *Didymella bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

O EA promoveu significativo aumento no acúmulo da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro. Esta atividade foi verificada tanto para o EA autoclavado como para o não autoclavado, indicando a presença de compostos indutores termo-resistentes no EA.

A atividade indutora de faseolina tem sido relatada também com extratos aquosos de outras plantas. Brand et al. (2010) avaliaram o efeito de extratos aquosos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro de forma semelhante a realizada nesse trabalho. Os autores relatam que houve acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro tratados com extrato vegetal de alho. Todas as doses foram superiores ao tratamento testemunha, não havendo diferença entre estas. No entanto, as doses de 1,0 e 3,0% do extrato vegetal induziram acúmulo similar de faseolina, com valor de 1,30. No entanto, esse valor foi inferior ao tratamento com o indutor Acibenzolar-S-metil. O extrato de arruda também induziu acúmulo de fitoalexinas conforme a concentração empregada, sendo que, na concentração de 3,0%, foi superior ao ASM.

Segundo Snyder e Nicholson (1990) o controle da antracnose do sorgo causada por *Colletotrichum sublineolum* está relacionada ao efeito protetor das fitoalexinas e também em função da velocidade de resposta da planta no acúmulo desses compostos. Assim, o acúmulo rápido de fitoalexinas pela planta pode ser decisivo na defesa mesmo em condições em que o patógeno entre em contato com a planta no momento do tratamento com o elicitor.

A atividade indutora de faseolina pelo EA de *C. citriodora* representa importante indicativo de seu potencial elicitor. No entanto, as fitoalexinas que mais tem merecido estudos nessa área são as deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolina em soja. Segundo Cavalcanti et al. (2005), mesocótilos estiolados de sorgo e cotilédones de soja são consideradas excelentes ferramentas em estudos envolvendo a ação eliciadora de moléculas. Em feijoeiro, Durango et al. (2002) demonstraram a ligação entre a produção de fitoalexinas em cultivares de feijoeiro e a resistência ou suscetibilidade a patógenos.

O fato do extrato aquoso de *C. citriodora* ser capaz de induzir enzimas de defesa tanto nas culturas de pepino como de feijão confere com o aspecto de não especificidade do fenômeno de indução de resistência. Segundo Sticher; Mauch-Mani; Métraux (1997), esse efeito é refletido não somente pelos diferentes indutores passíveis de uso, mas também pelo amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta pode ser protegida. Kessler e Baldwin (2002) completam que esse aumento na resistência pode ser efetivo contra uma ampla faixa de patógenos e

parasitas, incluindo fungos, bactérias, vírus, nematóides, plantas parasitas e até mesmo insetos herbívoros.

5.3 Atividade local e sistêmica do extrato aquoso em pepino e feijão

O EA mostrou atividade local tanto reduzindo a severidade da antracnose em pepino bem como aumentando a atividade de peroxidases em pepino e em feijão. De acordo com muitos autores, a resistência induzida pode ser apenas local ou sistêmica (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; VAN LOON, 1997). Nos casos em que rizobactérias são agentes de indução, geralmente há sistemicidade (ROMEIRO, 2008).

É possível que a atividade antifúngica sobre *C. lagenarium* apresentada pelo EA de *C. citriodora* sobre a germinação de esporos e formação de apressórios relatada por Bonaldo et al. (2004) possa contribuir para a redução na severidade da antracnose em pepino. Estes autores também avaliaram o número e o tamanho de lesões de *C. lagenarium* na primeira e segunda folha de plantas de pepino, sendo que apenas a primeira folha havia recebido o tratamento com extrato aquoso de *C. citriodora*. Eles também não obtiveram redução na doença na folha não tratada, sugerindo a ausência de efeito sistêmico em pepino pelo extrato aquoso de *C. citriodora*.

Por outro lado, a indução de peroxidases nas folhas de pepino tratadas foi pertinente com a redução na severidade da doença. Esses dados obtidos mostram a importância do estudo da atividade de peroxidases como uma das respostas de defesa manifestadas pelas plantas (BOAVA et al., 2010; CONTI et al., 1994).

Di Piero e Pascholati (2004) avaliaram o efeito do extrato aquoso do cogumelo *Lentinula edodes* em plantas de pepino e observaram aumento na atividade local e sistêmica de peroxidases no nono e décimo segundo dias após o tratamento, respectivamente (no terceiro e sexto dia após a inoculação com o patógeno *Colletotrichum lagenarium*).

Segundo Pascholati e Leite (1995), a proteção induzida é dependente do intervalo de tempo que ocorre entre o tratamento com o indutor e a inoculação do patógeno, indicando que mudanças específicas no metabolismo da planta envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias são importantes no fenômeno da

resistência induzida. Nesse sentido, Guzzo (2004) verificou indução local e sistêmica de enzimas de defesa em plantas de cafeeiro pelo tratamento com o ativador de plantas ASM.

Segundo Heil e Bostock (2002), plantas induzidas e, posteriormente, submetidas à inoculação do patógeno apresentam alterações dos eventos bioquímicos, promovem o acionamento de outros mecanismos, diferente do observado em plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno, que apresentam menor alteração desses eventos.

Nesse sentido, muitos ensaios tem demonstrado significativo acúmulo de enzimas relacionadas à defesa das plantas, comumente 48 ou 72 horas após o tratamento elicitor, embora a expressão da planta induzida pode demorar de alguns dias a uma semana (HAMMERSCHMIDT & KUC, 1982).

5.4 Dose de resposta do extrato aquoso em pepino e feijão

Um dos critérios para confirmação se a resistência exibida pela planta foi induzida é não haver magnitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado, à semelhança do que se observa em casos típicos de uso de agrotóxicos (ROMEIRO, 2008).

No entanto, se um indutor é biótico, há necessidade de uma quantidade mínima de células em contato com a planta para haver indução, mas, uma vez expressa essa resistência, aumentos na quantidade de células do indutor não correspondem a um aumento na resistência (VAN LOON et al., 1994).

Nesse trabalho, o EA de *C. citriodora* reduziu a severidade da antracnose em pepino e induziu a atividade de peroxidases em plântulas de pepino e feijoeiro permitindo ajuste quadrático do efeito do EA a partir das concentrações utilizadas. Considerando os aspectos da indução de resistência e que houve efeito mais expressivo do EA a partir da concentração de 5%, é possível que a concentração de elicitores no EA, em concentrações inferiores a 5%, não seja suficiente para desencadear mecanismos de defesa em pepino e feijão.

5.5 Efeito do número de aplicações na indução de resistência em pepino e feijão pelo extrato aquoso

O EA aplicado duas vezes (uma três dias e outra seis dias antes da inoculação com o patógeno) apenas mostrou atividade superior em relação a uma única aplicação (três dias antes da inoculação) sobre a severidade da antracnose em pepino. O fato de o número de aplicações não ter induzido significativo aumento na atividade de peroxidases, é possível que duas aplicações possam ter contribuído no controle por permitir maior acúmulo de compostos antifúngicos, presentes no EA, na superfície da planta. Por outro lado, Kuhn (2007) observou que tratamentos com *Bacillus cereus* e ASM mostraram a tendência em aumentar a síntese de peroxidases em plantas de feijoeiro conforme o aumento no número de aplicações realizadas.

Iriti e Faoro (2003) observaram que a aplicação de ASM, 2 ou 3 vezes em feijoeiro, antes da inoculação com *Uromyces appendiculatus*, apresentou 99,6 e 100% de redução das pústulas, respectivamente.

De maneira geral, o patossistema pepino e *C. lagenarium* apresentou resultados bem mais expressivos nos bioensaios, confirmando as informações de este ser um patossistema adequado e interessante para avaliação em ensaios de indução de resistência. Além disso, a realização de bioensaios com plântulas de pepino, utilizando-se os cotilédones para tratamentos e avaliação também se mostra muito eficiente e permite a realização de bioensaios de modo rápido (LABANCA, 2002).

Os bioensaios em plântulas de feijoeiro apresentaram resultados menos expressivos dos obtidos em cotilédones de pepino. No entanto, esses bioensaios apresentaram resultados semelhantes aos obtidos aplicando os tratamentos nos trifólios de plantas cultivadas em vasos, indicando que as respostas apresentadas estavam pertinentes. Esses bioensaios se tornaram muito importantes em estudos dessa natureza, onde se dispõe de volumes muito limitados dos tratamentos, como é o caso das frações obtidas das cromatografias. Outra vantagem desses bioensaios é que contribuem para o emprego de mais plantas por parcela, ajudando a reduzir os erros experimentais oriundos da variabilidade genética entre plantas.

A capacidade do EA em ativar mecanismos de defesa tanto em pepino como em feijão está de acordo com um dos critérios que estabelecem a resistência exibida pela planta foi induzida, que é a ausência de especificidade. Segundo Pascholati e Leite (1995), a não especificidade da resistência induzida em plantas é refletida não somente pelos diferentes indutores passíveis de uso, mas também no amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta é protegida.

Outro aspecto importante que deve ser destacado é de que indutores de resistência devem ser utilizados com cautela, pois o efeito negativo na produtividade ocorre em situações em que o indutor é utilizado repetidas vezes, em doses elevadas e na ausência de patógenos (CABRAL, 2009). Tal efeito se deve à indução de resistência representar um custo metabólico para a planta (KUHN, 2007; WALTERS & HEIL, 2007). Heil et al. (2000) observaram que plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) não tratadas com ASM apresentaram crescimento rápido e maior peso da biomassa do que as plantas tratadas com o indutor. Isso se deve provavelmente à competição entre a produção de compostos para a resistência contra o patógeno e para o crescimento da planta.

5.6 Atividade das frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio

A precipitação fracionada com sulfato de amônio é uma técnica muito importante e comumente utilizada para separação de proteínas.

Di Piero; Wulff e Pascholati (2006) utilizaram a precipitação fracionada com sulfato de amônio para identificar frações com atividade biológica a partir do extrato bruto de basidiocarpos do cogumelo *Lentinula edodes* e avaliaram o efeito das frações obtidas sobre a severidade da antracnose em plântulas de pepino e obtiveram redução na severidade da antracnose a partir da fração com saturação de 40-80%. Na sequência, essa fração foi submetida à cromatografia de troca iônica.

Iurkiv (2009) realizou o fracionamento do extrato aquoso do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* empregando sulfato de amônio e pode selecionar as frações de 40-60, 60-80 e 80-100% como potenciais indutores de resistência em soja, embora não foram eficientes em ativas fitoalexinas. Por outro lado, a fração de 0-20% mostrou característica supressora da enzima fenilalanina amônia-liase.

No entanto, a precipitação fracionada com sulfato de amônio pode não ser eficiente para separação de determinadas proteínas. Lima et al. (2008) buscaram a purificação da ricina a partir de torta de mamona (*Ricinus communis*) pela precipitação com sulfato de amônia e observaram que houve a precipitação de ricina e outras proteínas em todas as frações, não sendo possível a purificação.

Nesse trabalho, o fracionamento empregando sulfato de amônio não foi eficiente na obtenção de frações ativas. É possível que possa ter ocorrido perda de compostos elicitores durante a diálise, necessária para remoção do sal proveniente do sulfato de amônio. Além disso, conforme a natureza dos compostos elicitores presentes no EA, estes podem não ter sido agrupados, mas sim diluídos entre as frações.

5.7 Atividade das frações obtidas por cromatografia de troca iônica

Ensaio preliminares de fracionamento através de CTI foram realizados sem a liofilização do extrato e das frações obtidas, que, por isto, não se obteve resultados significativos nos bioensaios com as frações. Os resultados apresentados foram conduzidos com o extrato e as frações liofilizadas e ressuspensas em 10 mL de água destilada, de maneira que cada fração pudesse apresentar uma concentração de seus componentes não inferior ao mesmo volume de extrato aquoso a 20%.

O material adsorvido à resina DEAE-Celulose quando removido com NaCl ou bicarbonato de amônio em procedimento “step wise” permitiu melhor separação das frações em comparação da remoção do material adsorvido utilizando gradiente linear. Observação semelhante foi realizada por Di Piero (2003) durante o fracionamento em CTI do extrato aquoso de basidiocarpos do cogumelo *Lentinula edodes*.

Não foram obtidas frações em CTI empregando tampão Tris-HCl que apresentassem atividade biológica satisfatória, tanto na redução da severidade das doenças como na atividade de enzimas relacionadas à defesa, tanto em pepino como em feijão. Tanto nessa CTI como na precipitação fracionada com sulfato de amônio, as frações passaram por processo de diálise, assim, é possível que a membrana de diálise empregada, com limite de exclusão de 12-14 kDa, tenha permitido a perda de compostos elicitores.

A utilização de tampão bicarbonato de amônio permitiu a obtenção de frações com maior conteúdo de carboidratos e proteínas, e frações com atividade elicitora. Bonaldo (2005) concluiu em seu trabalho que a utilização de tampão bicarbonato de amônio facilita a etapa de purificação, proporcionando maior rendimento das frações. Além disso, segundo o mesmo autor, o emprego desse tampão proporcionou a obtenção de frações com atividade fungitóxica sobre *C. lagenarium* e *C. sublineolum* a partir do extrato da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O pico I foi correspondente ao material não retido na resina DEAE-Celulose. Como essa resina é de troca aniônica, ficam ligadas as proteínas que apresentam carga líquida negativa. Dessa forma, o pico I corresponde as proteínas que apresentam carga líquida positiva nas condições do tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0.

Foram selecionadas as frações I, II e IV para fracionamento em CFG. Estas frações apresentaram melhores resultados, embora, de maneira geral, apresentaram atividade inferior ao extrato aquoso.

Zanardo; Pascholati e Fialho (2009) realizaram o fracionamento do extrato de *Saccharomyces cerevisiae* em CTI e observaram que as frações do sobrenadante não ligadas à resina DEAE-celulose (pico I da cromatografia) ou ligadas à resina (pico II) reduziram em 81 e 72% a severidade da antracnose em cotilédones de pepino em comparação a testemunha água.

Cavalcanti; Resende; Oliveira (2007) realizaram o fracionamento do extrato aquoso a frio de pó de tecido necrótico de lobeira (*Solanum lycocarpum*), infectado por *Crinipellis pernicioso* por precipitação salina e cromatografia de troca iônica. As frações obtidas mostraram-se capazes de elicitar diferencialmente a atividade de peroxidases de guaiacol quando pulverizadas em plantas de tomateiro. Os mesmos autores ainda relatam uma forte possibilidade de os picos obtidos apresentarem uma ou mais proteínas capazes de elicitar respostas de defesa no tomateiro, via esquemas simples de purificação.

Nenhuma das frações obtidas promoveu estímulo na doença. Bonaldo (2005) obteve frações de *Saccharomyces cerevisiae* em CTI em Tris-HCl que em condições controladas de câmara de crescimento reduziram a severidade de *C. lagenarium* em pepino; no entanto, em condições de casa de vegetação, observou resultado

inverso, cujas frações proporcionaram estímulo na doença. Segundo o autor, esse resultado pode ter ocorrido devido ao fornecimento de nutrientes pelas frações.

5.8 Atividade das frações obtidas por cromatografia de filtração em gel

A utilização da cromatografia de filtração em gel (CFG) não foi eficiente na separação de compostos provenientes das frações da CTI que apresentaram alguma atividade. A única fração obtida que apresentou alguma atividade em relação a testemunha tampão, ou efeito semelhante ao EA, foi o único pico apresentado a partir da fração I da CTI, provalmente pela CFG não ter sido eficiente em separar os componentes dessa fração. Essa fração apresentou massa molecular relativa em torno de 1,2 kDa.

Com relação ao fracionamento em CFG do pico II da CTI com tampão bicarbonato de amônio, foram separados dois picos protéicos, sendo o pico I contendo também um pico glicídico. No entanto, esses dois picos não mostraram atividade em pepino e feijão. É possível que a atividade da fração II da CTI seja resultado da atividade conjunta dos picos obtidos na CFG. Essa observação é também pertinente para a fração IV da CTI, da qual foram obtidos quatro picos protéicos, mas com atividade individual praticamente nula.

Pelos resultados obtidos, a CFG não foi eficiente em fracionar compostos com atividade destacável em pepino e feijão. No entanto, fornece-nos informações importantes sobre as características das frações obtidas na CTI.

A ausência de frações que pudessem superar o EA na atividade elicitora sugere que não foram obtidas frações supressoras pelas técnicas de fracionamento empregadas. Wulff e Pascholati (1999) encontraram uma fração supressora da atividade de fitoalexinas em sorgo a partir do extrato da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os mesmos autores relatam a importância de se obter uma solução elicitora mais pura possível, pois, dessa forma, moléculas que interferem na atividade não são mantidas na preparação elicitora.

5.9 Caracterização das frações de maior atividade

A atividade de peroxidases em pepino e o acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijão foram os bioensaios que permitiram melhor expressividade dos resultados da atividade de proteínase e do tratamento térmico sobre as frações. Em ambos, a fração glicoprotéica I teve sua atividade inibida quando tratada com proteínase. Assim, podemos considerar que a porção protéica é necessária para a máxima expressão da atividade elicitora. Outro resultado importante é que essa redução na atividade da fração deu-se apenas pelo tratamento com proteínase mas não pelo tratamento térmico. Isso sugere a presença de compostos elicitores termoestáveis na fração.

A fração II promoveu resultados semelhantes, sendo capaz de induzir peroxidases em pepino e faseolina em feijão, no entanto não teve sua atividade reduzida significativamente pelo tratamento térmico e com proteínase. Tanto a fração I como a II apresentam glicídios, sugerindo que a atividade indutora de resistência do EA tem a contribuição parcial de glicoproteínas.

Segundo Braga (2008) são poucos os eliciadores de natureza protéica que não tem carboidrato como parte componente da molécula. Muitas glicoproteínas são potentes eliciadoras da síntese de fitoalexinas, porém em poucas têm sido determinada qual a fração responsável pela atividade detectada.

Parker et al. (1991) purificaram um elicitor glicoprotéico a partir de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Este elicitor teve sua atividade abolida pelo tratamento com proteínase, mas foi resistente à autoclavagem. Assim, a natureza protéica ou glicoprotéica de um elicitor não implica em suscetibilidade ao tratamento térmico por autoclavagem (WULFF & PASCHOLATI, 1999).

Existem inúmeros outros relatos de obtenção de eliciadores a partir de material biológico. Di Piero (2003) obteve ação ativadora de defesa a partir do extrato aquoso proveniente do cogumelo *Lentinula edodes* em plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium*. Além disso, esse autor obteve frações protéicas do extrato aquoso e de um pico eluído de cromatografia de troca iônica que foram efetivas na proteção de plântulas de pepino, com aumento de atividade de peroxidases. Basse et al. (1992) obtiveram glicopeptídeos a partir da digestão de uma invertase de levedura por α -quimiotripsina, que foram ativos na indução de

etileno e respostas de atividade de fenilalanina amônia-liase em células cultivadas de tomateiro. Guzzo e Moraes (1997) caracterizaram um eliciador de fitoalexina em soja a partir de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*. Bailey (1995) conseguiu purificar uma proteína (22,5 kDa) de filtrado de cultura de *Fusarium oxysporum* que induziu etileno e necrose em folhas de *Erythroxylum coca*.

Segundo Braga (2008), o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose em plantas de feijão, possui, em suas paredes celulares, eliciadores glicoprotéicos capaz de induzir a produção da fitoalexina faseolina em tecidos de feijão.

O fato da fração II não ter sua atividade totalmente abolida pela ação da proteínase não descarta a possibilidade de natureza glicoprotéica, pois a indução pode ocorrer, mesmo que parcial, a partir da porção de carboidrato intacta (SCHAFFRATH et al., 1995).

A presença de compostos elicitores termo-resistentes no EA também é sugerida pelos resultados obtidos por Bonaldo et al. (2004), que, embora tenham encontrado aumento na atividade antifúngica do extrato de *C. citriodora* pela autoclavagem, para indução de mecanismos de defesa em plantas, obtiveram efeito semelhante entre extrato autoclavado e não autoclavado.

A fração IV também mostrou atividade na indução de peroxidases em pepino, atividade que não foi significativamente reduzida pela proteínase. Por esta fração praticamente não conter açúcares redutores, é provável que outros compostos estejam envolvidos e contribuam na indução global promovida pelo EA.

A variada natureza química dos elicitores demonstra que não há uma característica estrutural única que determine a atividade elicitora (SMITH, 1996), embora a estrutura da molécula seja importante no reconhecimento dos elicitores pela planta. Em alguns casos, a atividade elicitora pode ocorrer de maneira sinérgica, pela atuação de dois ou mais elicitores (DIXON & LAMB, 1990). Essa atuação sinérgica entre compostos com potencial elicitor, possivelmente seja responsável pela atividade elicitora do extrato aquoso de *C. citriodora*.

6. CONCLUSÕES

O extrato aquoso de *C. citriodora* apresenta compostos elicitores termo-resistentes, mas a autoclavagem sequencial pode comprometer parcialmente a atividade indutora.

O extrato aquoso de *C. citriodora* é capaz de induzir mecanismos de defesa em pepino e feijoeiro, com destaque para peroxidases e β -1,3-glucanases em pepino e peroxidases e faseolina em feijão.

A cromatografia de troca iônica permitiu o fracionamento parcial de compostos biologicamente ativos, porém com menor efeito em relação ao extrato aquoso.

Proteínas e/ou glicoproteínas presentes no EA de folhas de *C. citriodora* tem efeito na indução de resistência em pepino à antracnose e feijoeiro ao crestamento bacteriano comum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, G.M. et al. Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. **Microbiological Research**, v.166, n.4, p.268-281, 2011.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, 5 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

AL-ASKAR, A.A.; RASHAD, Y.M. Arbuscular mycorrhizal fungi: a biocontrol agent against common bean *Fusarium* root rot disease. **Plant Pathology Journal**. v.9, n.1, p.31-38, 2010.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds.) **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV. 2007, 382p.

ALVES FILHO, J.P. **Uso de agrotóxicos no Brasil**. São Paulo: Annablume, 2002, 188p.

AYERS, A.R. et al. Host-pathogen interaction. XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. **Plant Physiology**, v.57, p.766-774, 1976.

BAILEY, J.A.; BURDEN, R.S. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused by *tobacco necrosis virus*. **Physiological Plant Pathology**, v.3, n.1, p.171-177, 1983.

BALMÉ, F. **Plantas medicinais**. São Paulo: Hemus. 2004, 398p.

BATISH, D.R. et al. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, v.23, p.1209–1214, 2004.

BAILEY, B.A. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, v.85, p.250-255, 1995.

BASSE, C.W.; BOCK, K.; BOLLER, T. Elicitors and suppressors of defense response in tomato cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.10258-10264, 1992.

BETTIOL, W. (Ed.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

- BETTIOL, W. Métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, Cap.5, 2001, p.123-140.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds) **Manual de Fitopatologia – Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. Cap.37, p.333-349.
- BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas**: observar, identificar, luchar. Madrid: Ed. Mundi-Presa, 1996. 301p.
- BLUM, L.E.B.; CARES, J.E.; UESUGI, C.H. **Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas**. 1 ed. Brasília: Otimismo, 2006, 265p.
- BOAVA, L.P. et al. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.168-172, 2010.
- BOKSHI, A.I.; MORRIS, S.C.; DEVERALL, B.J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, London, v.52, n.1, p.22-27, 2003.
- BONALDO, S.M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. Piracicaba, 2005. 150p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BONALDO, S.M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v.33, n.4, p.383-387, 2007.
- BONALDO, S.M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.128-134, 2004.
- BORSATO, L.C.; DI PIERO, R.M.; STADNIK, M.J. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.35, n.5, p.318-322, 2010.
- BOTSARIS, A.S.; BOORHEM, R.L.; CORRÊA, C.B.V. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone Editora Ltda. 550 p. 1995.
- BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds) **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. Cap.9, p.305-346.

BRAND, S.C. et al. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural** online, Santa Maria, 2010.

BURDEN, R.J.; BAILEY, J.A. Structure of the phytoalexin from soybean. **Phytochemistry**, v.14, p.1389-1390, 1975.

BURG, I.C.; MAYER, P.H. **Alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. 30 ed. Francisco Beltrão: Grafit Gráfica e Editora Ltda. 2006, 153p.

BUZI, A. et al. Induction of resistance in melón to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.152, p.34-42, 2004.

CABRAL, C.P. **Eficiência de indutores de resistência no controle da mancha-aquosa no meloeiro**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2009. 65p.

CAMPOS, A.D. et al. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.15, n.3, p.129-134, 2003.

CAMPOS, A.D. et al. Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CAVALCANTI, L.S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263p.

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

CHEONG, J.J.; HAHN, M.G. A specific, high-affinity binding site for the hepta β -glucoside elicitor exists in soybean membranes. **The Plant Cell**, v.3, p.137-147, 1991.

COLPAS, F.T. **Atividade eliciadora de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.)**. Maringá: UEM, 2002. 63p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá.

CONTI, G.C. et al. Induced systemic resistance against *Sphaeroteca fuliginea* in cucumber: efficiency of *Tobacco necrosis virus* and copper sulphate in eliciting defence reactions. **Journal of Phytopatology**, v.140, n.2, p.123-132, 1994.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The Nature and Praticce of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.61, p.273-282, 2002.

CORNELISSEN, B.J.C.; MELCHERS, L.L. Strategies for controle of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.709-712, 1993.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, vol. I. 1986. 1031p.

CRAVEIRO, A.A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 210p.1981.

DALISAY, R.F.; KUC, J.A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.47, p.315-327, 1995.

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

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.243-250. 2004.

DI PIERO, R.M.; WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.175-180, 2006.

DIXON, R.A. et al. Phytoalexin induction in french bean: intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.71, n.2, p.251-256, 1983.

DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.339-367,1990.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Baltimore, v.7, p.1085-1097, 1995.

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

DUNCAN, R.W.; SINGH, S.P.; GILBERTSON, R.L. Interaction of Common Bacterial Blight Bacteria with Disease Resistance Quantitative Trait Loci in Common Bean. **Phytopathology**, v.101, n.4, p.425-435, 2011.

DURANGO, D. et al. Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. **Molecules**, Basel, v.7, n.11, p.817-832, 2002.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.235-264, 1986.

EL-ROKIEK, K.G.; EID, R.A. Allelopathic effects of *Eucalyptus citriodora* on amaryllis and associated grassy weed. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, p.887-899, 2009.

FAULIN, M.S.A.R. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: parâmetros bioquímicos e da produção**. 2010. 147p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, D.F. **SISVAR: Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.0**. Lavras: DEX/UFLA, 2007. CD-ROM. Software.

FIORI, A.C.G. **Efeito de *Cymbopogon citrates*, *Eucalyptus citriodora*, *Ageratum conyzoides* e *Achillea millefolium* no crescimento vegetativo de *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm**. Maringá, 1998, 70p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá-UEM.

FIORI, A.C.G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.148, p.483-487, 2000.

FIORI-TUTIDA, A.C.G. **Uso de extratos dos cogumelos *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinem no controle *in vitro* de *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* e na indução de resistência em trigo à *Bipolaris sorokiniana***. Maringá, 2003, 112p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá-UEM.

FRANZENER, G. et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v.25, p.503-507, 2003.

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

FREITAS, M.O.; LIMA, M.A.S; SILVEIRA, E.R. Compostos polifenólicos do kino de *Eucalyptus citriodora*. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1926-1929, 2007.

FRY, S.C. Cross linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.165-186, 1986.

GÁLIS, I.; SMITH, J.L.; JAMENSON, P.E. Salicylic acid-, but not cytokinin-induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.161, p.459-466, 2004.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 256p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

GUZZO, S.D.; MORAES, W.B.C. Purificação e caracterização parcial de um eliciador de fitoalexina em soja, a partir de urediníósporos de *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.396-402, 1997.

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

HAMMERSCHMIDT, R.; DANN, E.K. **Induced resistance to disease**. In: Rechcigl, N.A. & Rechcigl, J.E. (Ed.) *Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers. 1997. pp. 177-199.

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

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

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.-P.; VAN LOON, L.C. Induced resistance: a summary of paper presented at the first international symposium on inducing resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.1-6, 2001.

- HAMMOND-KOSACK, K.; PARKER, J. Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.177-193. 2003.
- HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 503-512, 2002.
- HEIL, M. et al. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation cost? **Journal of Ecology**, Oxford, v. 88, p. 645-654, 2000.
- HELDT, H.-W. **Plant Biochemistry**. 3 ed. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005, 630p.
- HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.
- HSU, S.Y.; KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.
- IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 3, p. 171-180, 2003.
- IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**. Marechal Cândido Rondon. 2009, 115p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- JI, C.; KUC, J. Purification and characterization of an acidic β -1,3-glucanase from cucumber and its relationship to systemic disease resistance induced by *Colletotrichum lagenarium* and *Tobacco necrosis virus*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.8, n.6, p.899-905, 1995.
- KAGALE, S. et al. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.65, p.91-100, 2004.
- KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases-regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**. Wroclaw, v.8, p.809-824, 2003.
- KESSLER, A.; BALDWUIN, I.T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analyses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 229-328, 2002.

KRAMER, J.K.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.27, p.887-900, 1997.

KRISTENSEN, B.K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S.K. Barley coleoptiles peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v.120, p. 501-5012, 1999.

KUĆ, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 9-12, 2001.

KUHN, O.J. et al. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.251-302, 2006.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed) **Manual de Fitopatologia – Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. Cap.32, p.293-302.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolina em soja**. 2002. 118p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. Rio de Janeiro: Record, 172 p. 1993.

LEE, S.H.; KIM, E.S.; LEE, M.Y. Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. **Phytochemistry**, v.58, p.859-864, 2001.

LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. Fisiologia e bioquímica de doenças fúngicas. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds) **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. Cap.3, p.115-152.

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

LIMA, M.R. et al. **Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio**. In: III Congresso Brasileiro de Mamona, Salvador, 2008. Disponível em

<<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/trabalhos/OLEO%20E%20CO-PRODUTOS/OCP%2007.pdf>> Acesso em 12 de dezembro de 2008.

LIU, H. et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.35, p.263-269, 2005.

LO, L.C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.21-31, 1996.

LO, S-C. C.; NICHOLSON, R. L. Compostos fenolicos e a importancia nas doencas de plantas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Eds.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba, SP: FEALQ, p.285-303, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 544p.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.25, p.244-249, 1999.

MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P. BECKER, K. **Plant secondary metabolites**. New Jersey: Humana Press, 2007. 130p.

MARTINS, E.M.F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds) **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. Cap.12, p.387-410.

MAUCH, F.; STAEHELIN, L.A. Functional implications of the subcelular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanases in bean leaves. **Plant Cell**, Baltimore, v.1. p.447-457, 1989.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, New York, v. 18, p. 193-215, 1979.

MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 13-18, 2001.

MONTOYA, C. et al. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v.43, p.443-449, 2010.

MOREIRA, C.G.A. et al. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito

sobre *Colletotrichum lagenarium* **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.332-337, 2008.

MOTOYAMA, M.M. et al. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v.25, n.2, p.509-512, 2003.

MÜLLER, K.O. Studies on phytoalexins. I. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infection with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. **Australian Journal of Biological Sciences**, East Melbourne, v.11, n.1, p.275- 300, 1958.

MUÑOZ, F. **Plantas Medicinales y Aromáticas** – Estudio, cultivo y procesado. Barcelona: Mundi-Prensa, 4 ed. 2002.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, v.107, p.19-28, 1992.

OKOT-KOTBER, M. et al. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.2410-2417, 2002.

OLIVEIRA, F. et al. **Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos**. São Paulo: Editora Atheneu. 2010. 145p.

PARKER, J.E. et al. An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplast. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.4, p.19-27, 1991.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. Piracicaba, 1998. 123p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap.22, p.417-454.

PENG, X. et al. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.32, p.377-387, 2004.

PURKAYASTHA, R.P. **Progress in phytoalexin research during the past 50 years**. In: Daniel, M.; Purkayastha, R.P. (Ed.). Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. New York. Marcel Dekker. 1995. p.1-39.

RANIERI, A. et al. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 25-35, 2001.

RAO, B.R.R. et al. Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, p.133-135, 2003.

REGO, A.M.; CARRIJO, I.V. Doenças das cucurbitáceas. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. (Ed.) **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. v.2, p.535-598.

RESENDE, M.L.V. et al. Perspectiva da indução de resistência em cacauzeiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotriazol (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.149-156, 2000.

RESENDE, M.L.V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Blackwell, v.51, n.5, p.621-628, 2002.

RITTER, H.; SCHULZ, G.E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, Baltimore, v.16, p.3426-3436, 2004.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV. 2001, 279p.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV. 2007, 269p.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds) **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. Cap.13, p.411-432.

RÖSLER, L. et al. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, Rockville, v.13, p.175-179, 1997.

SAETTLER, A.W, Common bacterial blight. In: SCHWARS, H.F.; STEADMAN, J.R.; HALL, H, R.; FOSTER, R.L. (ED.). **Compendium of bean diseases**. 2 ed. Saint Paul: APS PRESS, 2005, p.46-47.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Mancha angular. In: _____. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. P41-68.

SBALCHEIRO, C.C.; DENARDIN, N.D.; BRAMMER, S.P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do cretamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n.1, p.029-037, 2009.

SCHAFFRATH, U.; SCHEINPFLUG, H.; REISNER, H.J. Na elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in Rice: isolation, characterization and physiological properties. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.239-307, 1995.

SCHNEIDER, M. et al. Systemic acquired resistance in plants. **International Review of Cytology**, v.168, p.303-340, 1996.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W.R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activity in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v,45, p.219-304, 1994.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p. S54-S56, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.125-138.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds) **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. Cap.6, p.227-248.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharides signalling for defense responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p.223-233. 2001.

SILVA, H.S.A. et al. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase enzyme activities. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 288-295, 2004.

SILVA et al., Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v.55. n.5, p.377-383, 2008.

SILVA, P.H.M. et al. Produção de óleo essencial e balanço nutricional em *Corymbia citriodora* adubado com lodo de esgoto em diferentes espaçamentos. **Cerne**, Lavras, v.15, n.3, p.346-354, 2009a.

SILVA, E.G. et al. Alterações metabólicas em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas por *Pseudomonas* sp. e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.98-104, 2009b.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V. Resistência induzida em plantas contra patógenos. In: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. (Ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p. 221-234.

SILVA, M.B. et al. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas. IN: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: EPAMIG, Cap.3, p.33-54, 2010.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 189-196, 2007.

SINGH, H.P. et al. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. **Annals of Applied Biology**, v.146, p.89-94, 2005.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v. 132, p.1-45, 1996.

SNYDER, B.; NICHOLSON, R.L. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site response to fungal ingress. **Science**, v.248, p.1637-1639, 1990.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C. Efeito de acibenzolar-S-metil sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-curtobacterium. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, p.41-45, 2002.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P. Ineficiência de acibenzolar-S-metil na indução de resistência em feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.373-377, 2004.

SOARES, R.N. et al. Potencial de *Artemisia camphorata* (cânfora) no controle de fungo fitopatogênicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 31, Fortaleza, 1998. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.23 (Suplemento), p.284, 1998.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.16, p.265-304, 2008.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilaseoxigenase, clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinases em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.

STANGARLIN, J.R. et al. Plantas Medicinais: plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p. 16-21. 1999.

STICHER, I.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.235-270, 1997.

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

TAR'AN, B.; MICHAELS, T.E.; PAULS, K.P. Mapping genetic factors affecting the reaction to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* L. under field conditions. **Genome**, v.44, p.1046-1056, 2001.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004.

TOILLIER, S.L. et al. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.99-110, 2010.

TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A.S. **Fitopatologia**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed. 2010, 576p.

TUZUM, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and mutagenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p. 39-50, 2001.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

VALE, F.X.R. et al. **Quantificação de doenças - Quant** versão 1.0.1. Viçosa: UFV. 2001. Software.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 753-765, 1997.

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

VAN LOON, L.C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, p. 245-264, 1994.

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

- VAUGHN, K.C.; DUKE, S.O. Function of polyphenol oxidases in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 60, p. 106-112, 1984.
- VAUGHN, K.C.; LAX, A.R.; DUKE, S.O. Polyphenol oxidases: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 72 p. 659-665, 1988.
- VIDHYASEKARAN, P. et al. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 against *Xanthomonas oryzae* in rice leaves. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 29, p. 155-167, 2001.
- VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms**. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press. 2008. 509 p.
- VIGO, S.C. et al. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.293-304, 2009.
- VIGO-SCHULTZ, S.C. **Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem**. 78p. Tese (Doutorado em Agronomia. Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp, Botucatu. 2008.
- VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v.189, p.60-69, 1993.
- VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v.9, p.203-209, 2004.
- XIANG, L.; MOORE, B.S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, Washinton, v.187, p.4286-4289, 2005.
- WALTERS, D.R.; HEIL, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.71, n.1-3, p.3-17. 2007.
- WALTERS, D.R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, v.28, n.6, p.459-465, 2009.
- WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strain of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 1508-1512, 1991.
- WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.197-205, 1990.

WORLD AGROFORESTRY CENTRE. *Corymbia citriodora*. Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/sea/Products/AFDbases/af/asp/SpeciesInfo.asp?SPID=18107>> Acesso em 15 de outubro de 2010.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial Characterization of Sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 428-435, 1999.

WULFF, N. Bactérias causadoras de doenças vegetais. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds) **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. Cap.2, p.51-114.

ZANARDO, N.M.T.; PASCHOLATI, S.F.; FIALHO, M.B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.11, p.1499-1503, 2009.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W.S.; OLIVEIRA, S.H.F. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa: UFV, DPF, 2007, 168p.