



KÁTIA VIANA XAVIER

**EXTRATOS DE CASCAS DE MARACUJÁ E DE
LARANJA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM
CAFEIRO CONTRA A FERRUGEM E EM
TOMATEIRO CONTRA MANCHA
BACTERIANA**

LAVRAS - MG

2011

KÁTIA VIANA XAVIER

**EXTRATOS DE CASCAS DE MARACUJÁ E DE LARANJA NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIRO CONTRA A
FERRUGEM E EM TOMATEIRO CONTRA MANCHA BACTERIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Xavier, Kátia Viana.

Extratos de cascas de maracujá e de laranja na indução de resistência em cafeeiro contra a ferrugem e em tomateiro contra mancha bacteriana / Kátia Viana Xavier. – Lavras: UFLA, 2011.
84 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.
Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.
Bibliografia.

1. Oligogalacturonídeos. 2. *Hemileia vastatrix*. 3. *Xanthomonas vesicatoria*. 4. Pectina. 5. Fitopatologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.3

KÁTIA VIANA XAVIER

**EXTRATOS DE CASCAS DE MARACUJÁ E DE LARANJA NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM CAFEIEIRO CONTRA A
FERRUGEM E EM TOMATEIRO CONTRA MANCHA BACTERIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 5 de agosto de 2011.

Dra. Sara Maria Chalfoun EPAMIG

Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

LAVRAS - MG

2011

Aos meus pais, Jerônimo e Maria Helena, minha maior lição e exemplo de vida.

Aos meus irmãos, Karla, Francisco e Bruno, pelo companheirismo e apoio de sempre.

As minhas avós, Dorvina e Josefa, pelo zelo, carinho e amparo.

À verdadeira amiga, Juliana, pelo carinho, companheirismo, incentivo, paciência e AMIZADE.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização de um sonho (Mestrado) e à CAPES e ao INCT Café, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Mário Lúcio Vilela Resende, pela orientação, apoio, “paciência”, confiança, preocupação e ensinamentos.

Ao Dr. Pedro Martins R. Júnior, também orientador desta dissertação, pelo estímulo e contribuições valiosíssimas sem as quais este trabalho seria impossível.

A todos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial aos estagiários, Érica, Rodolpho, Joyce, Mirian e Vinícius.

A Daiane Franciele Miranda, que me ajudou de forma gigantesca durante dias, noites e finais de semana.

À Dra. Patrícia Gomes Costa e ao Dr. Ricardo Pereira Borges, pelos conselhos e ajuda inicial.

Ao Laboratório de Genética Molecular e Microrganismos da UFV, em especial a Janaína, pela ajuda nas análises das pectinases.

Às amigas Ana Karla, Érica, Lívia, Stefanny, Mari e Angélica, por todos os momentos de alegria, tristeza, angústias e dores (horas de PA).

A todos os meus primos (as) e tios (as), que torceram por mim, em especial à tia Lúcia, pelo incentivo e ajuda de sempre.

A todos os amigos do NEFIT, pelo convívio, amizade, ajuda e prosa.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Fitopatologia, pela atenção, conversas e amizade.

A todos que contribuíram para o êxito deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A indução de resistência em plantas contra doenças é uma alternativa ao uso de pesticidas, pois ativa os mecanismos de defesa latentes do hospedeiro. Hipotetiza-se que os extratos derivados de casca de laranja e de maracujá sejam capazes de atuar como indutores de resistência contra uma ampla gama de patógenos. Estes resíduos contêm grande quantidade de pectina, que pode ser fragmentada, física e/ou enzimaticamente, em oligogalacturonídeos (OGAs), potentes eliciadores de resposta de defesa em plantas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos à base de casca de maracujá e laranja na proteção e na indução de resistência em cafeeiro contra a ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e em tomateiro contra a mancha-bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). Mudanças de cafeeiro e tomateiro foram pulverizadas com extratos de casca de maracujá (M) e de laranja (L), produzidos com ou sem inoculação do agente produtor de pectinase, *Cladosporium cladosporioides* (cc), em duas concentrações, puros (100%) ou diluídos (50%). Mudanças de café e tomate foram inoculadas com *H. vastatrix* e *X. vesicatoria*, sete e quatro dias após a pulverização, respectivamente. Em cafeeiro, os extratos mais eficientes na proteção das plantas foram L50% + cc e L50% e, em tomateiro, M50% e M50% + cc. Estes extratos apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade *in vitro* a *H. vastatrix* e *X. vesicatoria*, respectivamente. No experimento de café, foi observado aumento na atividade de enzimas, ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO). Além disso, houve aumento nos teores de fenóis solúveis totais. No experimento de tomate, plantas pulverizadas com M50 e M50 + cc apresentaram aumento na atividade das enzimas de defesa, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liases (FAL), em relação às testemunhas pulverizadas com água. Foi observado também aumento nos teores de lignina e clorofila. Os extratos de casca de laranja e maracujá conferiram níveis de proteção satisfatórios, pois, possivelmente, houve reconhecimento dos OGAs por estas plantas, as quais ativaram as respostas de defesa. Evidenciou-se, portanto, que os extratos à base de casca de laranja e de maracujá foram eficientes na proteção e na indução de resistência em cafeeiro contra a ferrugem e em tomateiro contra a mancha-bacteriana.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*. *Xanthomonas vesicatoria*.
Oligogalacturonídeos. Pectina. Resistência.

ABSTRACT

The induction of resistance in plants against disease is an alternative method instead of pesticides, as active the resistance mechanisms in plants. It is hypothesized that extracts derived from orange and passion fruit peels, are able to induce resistance against a wide range of pathogens. These wastes contain appreciable amount of pectin, which can be fragmented, physical and/or enzymatically in oligogalacturonides (OGAs), a potent elicitor of defense response in plants. Our aim was to evaluate the effect of extracts made of orange and passion fruit peels in the protection and induction of resistance in coffee plants against *Hemileia vastatrix* and in tomato plants against *Xanthomonas vesicatoria*. Coffee and tomato seedlings were sprayed with extracts of orange peels (L) and passion fruit peels (M), inoculated and not inoculated with *Cladosporium cladosporioides* (cc), at the concentrations of 100% and 50%. Seven and four days later, the plants were challenged with *H. vastatrix* and *X. vesicatoria* respectively. In the coffee assay, the best results of protection were the extracts L50% + cc and L50%, and in tomato, were M50% e M50% + cc. These extracts showed low inhibition of fungal germination and bacterial growth. In the coffee experiment, we observed an increased in the enzymes, ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), polyphenoloxidase (PPO), and peroxidase (POX) activities. Moreover, higher contents of total soluble phenolic. Treatment of tomato plants with M50 + cc and M50 showed an increase of defense enzymes activities, SOD, CAT, POX, PPO and FAL (phenylalanine ammonia-lyase), in comparison with water treated control. We also observed increased in the lignin depositions and chlorophyll contents. The extracts of orange and passion fruit peel showed satisfactory levels of protection, possibly because there was recognition of OGAs by the plants, which activate defense responses. Therefore, the extracts of orange and passion fruit peel were effective in the protection and induction of resistance to coffee rust and tomato bacterial spot.

Keywords: *Hemileia vastatrix*. *Xanthomonas vesicatoria*. Oligogalacturonides. Pectin e resistance.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO GERAL	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Indução de resistência no controle de doenças de plantas	11
2.1.1	Oligogalacturonídeos na indução de resistência	13
2.2	Culturas de interesse econômico	15
2.2.1	A cultura do cafeeiro	15
2.2.2	A cultura do tomateiro	16
2.3	Extratos vegetais no manejo da ferrugem do cafeeiro (<i>Hemileia vastatrix</i>) e da mancha-bacteriana do tomateiro (<i>Xanthomonas vesicatoria</i>)	16
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
	REFERÊNCIAS	21
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	25
	ARTIGO 1 Extratos de casca de laranja induzem resistência em cafeeiro contra a ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>)	25
	ARTIGO 2 Extratos de casca de maracujá induzem resistência em tomateiro contra a mancha-bacteriana (<i>Xanthomonas vesicatoria</i>)	55

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

No cenário atual, a agricultura busca um modelo de sustentabilidade, reduzindo ao mínimo o uso de pesticidas. Neste contexto surgem os métodos alternativos compatíveis com a qualidade ambiental, visando o manejo sustentável. Dentre estas estratégias destaca-se a resistência da planta, não somente por meio do uso de variedades resistentes, geneticamente modificadas, mas também da indução de resistência da própria planta.

A indução de resistência ocorre pela ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (RYALS et al., 1996). Os agentes de indução são denominados de eliciadores, sejam eles bióticos ou abióticos.

Os eliciadores bióticos podem ser derivados de bactérias, fungos, oomicetos e também de parede celular da própria planta, como os oligogalacturonídeos (OGAs). Estes são produzidos durante a infecção por patógenos (COOPER, 2010). Como exemplos de agentes bióticos têm-se os extratos vegetais que, geralmente, são constituídos por diversos tipos de eliciadores (BARGUIL et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2006). Por outro lado, as substâncias químicas são exemplos de eliciadores abióticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) (GUZZO et al., 2001).

Em diversos trabalhos tem sido relatada a eficiência de extratos vegetais no manejo de doenças de plantas (BARGUIL et al., 2005), pois estes apresentam, em sua composição, substâncias bioativas que são reconhecidas pelas plantas e ativam suas respostas de defesa.

Pesquisas realizadas com extratos provenientes de polpa cítrica ou casca de maracujá visando o controle de doenças por meio da indução de resistência

são bastante promissoras devido à alta concentração de pectina. Estas substâncias podem originar os oligogalacturonídeos (OGAs), fragmentos indutores de resistência.

A característica mais importante da indução de resistência é a não especificidade, ou seja, ocorre uma proteção generalizada contra uma ampla gama de patógenos. Sendo assim, um bom extrato indutor de resistência deve ser efetivo em diferentes interações planta-patógeno (SEQUEIRA, 1983).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos à base de casca de maracujá e laranja na proteção e na indução de resistência em cafeeiro contra a ferrugem e em tomateiro contra a mancha-bacteriana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Indução de resistência no controle de doenças de plantas

O controle químico tem sido a prática mais utilizada na proteção das plantas contra patógenos por apresentar rápido efeito e ser de fácil aplicação. Entretanto, o uso intensivo dos pesticidas leva ao surgimento de novas raças resistentes do patógeno e à quebra da resistência genética do hospedeiro (DE LORENZO et al., 2011). Além disso, o uso indiscriminado de pesticidas causa desequilíbrio ambiental e danos à saúde do homem, além de onerar os custos de produção (WALTERS et al., 2005).

A indução de resistência é uma estratégia alternativa no controle de doenças de plantas, pois consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes da própria planta por meio de eliciadores abióticos e bióticos (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997).

As plantas apresentam diversos mecanismos de resistência natural contra patógenos, como as barreiras pré-formadas que estão presentes mesmo antes do contato entre o patógeno e o hospedeiro (CHALFOUN; CASTAGNARO; DÍAZ RICCI, 2001). Estas barreiras de defesa constitutivas podem ser estruturais, como estômatos, cutícula, espessura da parede celular e tricomas, ou bioquímicas, como compostos fenólicos, alcaloides e glicosídeos cianogênicos (AGRIOS, 2005).

Uma vez ultrapassadas as barreiras constitutivas de defesa da planta, esta pode reconhecer o patógeno e desencadear uma série de mecanismos de resistência na tentativa de conter este agente agressor. Estes mecanismos de defesa induzidos podem ser estruturais, como papilas, lignificação, tiloses ou bioquímicos, como o acúmulo de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

O contato entre os microrganismos (ou padrões moleculares associados aos microrganismos - MAMPs) e o hospedeiro ocorre por meio de receptores ancorados na membrana plasmática. Logo após inicia-se uma cascata de sinalização, desencadeando uma ampla gama de mecanismos de defesa, protegendo as plantas contra uma possível invasão do patógeno (RESENDE et al., 2010).

Os MAMPs podem ser oriundos de bactérias, fungos, oomicetos e da parede celular dos vegetais. Os oligogalacturonídeos (OGAs) são os únicos MAMPs derivados da própria planta e podem ser produzidos durante a infecção por patógenos (COOPER, 2010).

Após o reconhecimento do MAMP ou eliciador, a primeira resposta de defesa é a explosão oxidativa ou geração de espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot). O H_2O_2 apresenta efeito direto sobre o patógeno ou atua no reforço da parede celular, formando uma barreira mecânica efetiva contra a penetração dos patógenos. Pode atuar também como mensageiro secundário, ativando a hidrolase do ácido benzoico, enzima responsável pela conversão do ácido benzoico em ácido salicílico. (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

As EAOs ocorrem, normalmente, na célula vegetal, mas quando estas se acumulam podem se tornar tóxicas à própria célula da planta. No entanto, as plantas possuem um conjunto de enzimas antioxidantes, tais como peroxidase (POX; EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidase (APX; CE 1.11.1.1), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e catalase (CAT; CE 1.11.1.6), que impedem a ação tóxica das EAOs, protegendo as células da planta (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Dentre as proteínas relacionadas com a patogênese (PRPs) sintetizadas pelas plantas em resposta ao ataque dos patógenos encontram-se as β -1,3-glucanases (PR-2; EC 3.2.1.39) e quitinases (PR-3; EC 3.2.1.14) (VAN LOON,

1997). As quitinases são enzimas que podem hidrolisar a quitina, principal componente da parede celular de fungos. As β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, os quais, juntamente com a quitina, são os principais componentes que conferem resistência à parede celular dos fungos (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993).

2.1.1 Oligogalacturonídeos na indução de resistência

Os oligogalacturonídeos são moléculas que contêm de dois a vinte resíduos de α -1,4-D-ácido galacturônico, derivados da parede celular das plantas durante o ataque do patógeno (HAHN; DARVILL; ALBERSHEIM, 1981). OGAs são liberados por ação de pectinases microbianas, as quais agem sobre as substâncias pécnicas presentes na lamela média e na parede celular primária das plantas (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001).

As enzimas pectinametilesterase (PME), endo e exo-poligalacturonase (endo- ou exo-PG) e pectina liase (PL) agem sinergicamente na degradação das substâncias pécnicas (SOARES et al., 2001; GUMMANDI; PANDA, 2003). As PMEs atuam catalisando a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, convertendo pectina em pectato com a liberação de metanol. Com isso favorece a atuação das PGs (GUMMANDI; PANDA, 2003).

As PGs hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico desesterificados. A degradação do ácido pécnico pelas PGs pode ocorrer a partir das extremidades (exo-PGs) ou de forma aleatória (endo-PGs) (MUTLU et al., 1999).

Aplicações exógenas de OGAs provocam respostas fisiológicas nos tecidos das plantas nos quais são produzidas as enzimas PGs. Exemplo desta atividade da poligalacturonase foi encontrado em suspensão de células

cultivadas de fumo, cenoura e rosa, bem como nos cotilédones de algodão (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001).

Segundo Kayshap et al. (2001), as liases rompem ligações glicosídicas, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do ácido galacturônico. Da mesma forma que PGs, estas também apresentam mecanismo de quebra do substrato a partir das extremidades (exo) ou de forma aleatória (endo) (UENOJO; PASTORE, 2007).

Os OGAs, quando reconhecidos pelas plantas, são capazes de disparar respostas de defesa, tais como a síntese várias enzimas. A fenilalanina amônia-liase (FAL, EC. 4.3.1.25) é a primeira enzima na rota dos fenilpropanoides, fornecendo precursores de lignina e fenóis (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997). A peroxidase, outra enzima da rota dos fenilpropanoides, participa da produção de fitoalexinas, espécies ativas de oxigênio e formação de barreiras estruturais. As PRPs, como β -1,3-glucanase e quitinase, podem ser induzidas durante a penetração dos fitopatógenos (STICHER, MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Subprodutos do setor agroindustrial, como o resíduo da indústria de suco de laranja ou de maracujá, podem ser utilizados para a obtenção dos OGAS, pois estes apresentam em sua composição grande quantidade de substâncias pécticas. Segundo Rivas et al. (2008), a casca de laranja contém cerca de 40% de pectina, enquanto a casca do maracujá apresenta de 10% a 20% de pectina na sua constituição (MANICA, 1981).

Uma das limitações ao uso de OGAS é a baixa eficiência de produção, sendo necessárias estratégias eficientes que permitam uma produção em larga escala. Dentre estas estratégias pode ser citada a clivagem por meio de enzimas produzidas por microrganismos (RESENDE et al., 2010).

A atividade eliciadora dos OGAs é bem definida e a aplicação exógena mostra potencialidade na indução de resistência. Contudo, muitos estudos ainda são necessários para a obtenção de formulações comerciais estáveis e eficientes.

2.2 Culturas de interesse econômico

2.2.1 A cultura do cafeeiro

O Brasil destaca-se por ser o maior produtor e exportador de café do mundo. No ano de 2010, foram produzidas no país 48,1 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado; o Vietnã produziu 16,5 milhões de sacas; a Indonésia, 9,35 milhões de sacas e a Colômbia, 8,1 milhões de sacas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011).

Dentre os fatores limitantes à produtividade do cafeeiro destaca-se a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix* Berkeley e Broome), que pode ocasionar danos de até 50% da produção, caso não sejam tomadas medidas de controle adequadas (ZAMBOLIM et al., 2002).

Pulverizações foliares com fungicidas sistêmicos têm sido eficientes para reduzir as perdas ocasionadas por esta doença (ZAMBOLIM et al., 2002). Porém, o controle químico causa desequilíbrio ambiental e danos à saúde humana, além de levar ao surgimento de novas raças resistentes do patógeno (WALTERS et al., 2005). Portanto, uma estratégia eficaz e de menor impacto ambiental para o manejo da ferrugem do cafeeiro é a indução dos mecanismos de defesa da planta.

Os extratos vegetais apresentam substâncias bioativas, capazes de disparar reações de defesa nas plantas (SANTOS et al., 2007). Extratos derivados de resíduos da indústria de alimentos têm sido citados como ativadores dos mecanismos de defesa de plantas (BAI et al., 2004).

2.2.2 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) encontra-se bastante desenvolvido no Brasil, sendo uma das hortaliças mais consumidas no mundo. Porém, a cultura está sujeita a várias doenças que podem limitar sua produção (KUROZAWA; PAVAN, 1995). Dentre estas doenças, a mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria*, se destaca por acarretar perdas consideráveis na produtividade e na qualidade do fruto (AL-DAHMANI et al., 2003).

A falta de produtos químicos eficazes para o manejo das doenças bacterianas do tomateiro e a resistência destas bactérias a antibióticos, como o sulfato de estreptomicina e produtos à base de cobre, estimularam esforços para desenvolver estratégias alternativas de manejo de doenças causadas por esse tipo de patógeno na cultura do tomateiro (GORE et al., 1999). Dentre estas estratégias, destaca-se a indução de resistência, que é caracterizada pela ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta em resposta a eliciadores abióticos e bióticos (STICHER et al., 1997).

A indução de resistência no tomateiro pode ser ativada pelo tratamento com diferentes agentes, tais como patógenos virulentos ou avirulentos, os fragmentos da parede celular bacteriana, substâncias químicas sintéticas e extratos vegetais (WALTERS et al., 2005).

2.3 Extratos vegetais no manejo da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e da mancha-bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas vesicatoria*)

O desenvolvimento da resistência dos fitopatógenos a fungicidas é um estímulo para a busca de novos protetores de plantas. Uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos no manejo de doenças de plantas é o uso de produtos

naturais. Dentre as opções de manejo, os extratos vegetais ricos em substâncias bioativas podem ser capazes de atuar como indutores de resistência. Os extratos de plantas podem apresentar efeitos na germinação e na viabilidade de esporos de fungos (CHANG et al., 2008).

Diversos trabalhos têm relatado a eficiência dos extratos vegetais, os chamados bioindutores, capazes de induzir resistência de amplo espectro em plantas a vários patógenos no manejo de doenças (BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al. 2009; CAVALCANTI et al., 2006; SANTOS et al., 2007).

Resultados promissores têm sido alcançados por meio de pulverizações com suspensão de uredósporos de *H. vastatrix* inativados termicamente e muitos extratos vegetais (SANTOS et al., 2007; COSTA ; ZAMBOLIM; RODRIGUES, 2007).

Extratos à base de folhas de cafeeiro infectadas pelo fungo *H. vastatrix* apresentam eficiência de proteção contra doenças fúngicas e bacterianas, como a ferrugem-do-cafeeiro (*H. vastatrix*) e a mancha-bacteriana do tomateiro (*X. vesicatoria*), respectivamente (BARGUIL et al., 2005; MEDEIROS et al. 2009).

As moléculas eliciadoras presentes nos extratos à base de resíduos da lavoura cafeeira podem ser originadas da parede celular do próprio fungo, constituída de moléculas de β -glucana e quitina, responsáveis por disparar respostas de defesa da planta, aumentando os níveis de compostos fenólicos e as atividades de peroxidases e polifenoloxidasas (GUZZO et al., 1987; MAXEMIUC-NACCACHE; DIETRICH, 1985). Como exemplo, cascas de frutos de café possuem em sua fração solúvel, carboidratos, proteínas, taninos e vários compostos fenólicos (PANDEY et al., 2000).

Extrato de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*), cacauzeiro e cupuaçuzeiro, infectados por *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa, apresentam moléculas eliciadoras advindas de paredes celulares do hospedeiro ou do próprio patógeno. Extrato aquoso de folha de café com

ferrugem (EFID) e extrato aquoso de lobeira infectada com *C. pernicioso* (VLA) foram testados por Santos et al. (2007) quanto à eficiência de proteção contra a ferrugem. Os autores observaram que EFID e VLA reduziram a severidade da ferrugem em 31% e 27%, respectivamente.

Em estudos recentes foi demonstrado que extratos de folhas de café (NEFID) apresentaram eficiência de proteção contra *X. vesicatoria* (MEDEIROS et al., 2009). Os autores verificaram que NEFID e acibenzolar-S-metil (ASM) conferiram proteção contra a mancha-bacteriana, reduzindo a severidade da doença em 65% e 69%, respectivamente

A eficiência de extratos vegetais no manejo da mancha-bacteriana foi relatada também por Cavalcanti et al. (2006), utilizando filtrado aquoso do fungo de *C. pernicioso* e extrato aquoso de ramos de lobeira, ambas infectadas por *C. pernicioso* em pulverizações foliares.

Costa, Zambolim e Rodrigues (2007) verificaram redução de mais de 77% na infecção causada por *H. vastatrix* em mudas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho pulverizadas com extratos de folhas de café, suspensões de conídios fúngicos e de células bacterianas.

Pesquisas realizadas com extratos provenientes de polpa cítrica ou casca de maracujá visando o controle de doenças através da indução de resistência são bastante promissoras devido à presença de alta concentração de substâncias pécnicas, as quais originam os OGAs, que são fragmentos indutores de resistência.

Cavalcanti et al. (2006), utilizando Ecolife[®], uma formulação à base de biomassa cítrica, na proteção de plantas de tomateiro contra *X. vesicatoria*, agente causal da mancha-bacteriana, obtiveram redução de 40% na área abaixo da curva de progresso da severidade da doença e maior atividade da enzima de defesa β -1,3-glucanase.

Pereira et al. (2008) avaliaram a aplicação extrato metanólico de casca de maracujá no controle da murcha-de-verticillium em mudas de cacaueteiro e verificaram que o mesmo reduziu em 19,2% a severidade da doença.

A característica mais importante da indução de resistência é a não especificidade, ou seja, ocorre uma proteção generalizada contra uma ampla gama de patógenos. Sendo assim, um bom extrato indutor de resistência deve ser efetivo em diferentes interações planta-patógeno (SEQUEIRA, 1983).

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos à base de casca de maracujá e laranja na proteção e na indução de resistência em cafeeiro, contra a ferrugem e em tomateiro, contra a mancha-bacteriana.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente estudo foi demonstrado que os extratos à base de casca de laranja foram mais eficazes para reduzir a severidade da ferrugem do cafeeiro, enquanto os extratos à base de casca de maracujá foram mais eficazes para reduzir a severidade da mancha-bacteriana do tomateiro. Contudo, ambos os extratos foram significativamente capazes de reduzir a intensidade da doença nestas culturas em relação à testemunha, quando utilizados em menores dosagens, o que é um indicativo de indução de resistência.

Sugere-se que estes extratos à base de resíduos da indústria de alimentos foram capazes de induzir respostas de defesa nas plantas de tomate e café, portanto, com potencial para serem usados contra múltiplos patógenos. No entanto, estudos adicionais em condições de campo devem ser realizados para demonstrar a eficácia e a utilização prática desses extratos no manejo de doenças.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. New York: Academic, 2005. 922 p.
- AL-DAHMANI, J. H. et al. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. **Plant Disease**, v. 87, n. 8, p. 913-919, Aug. 2003.
- BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, Sept./Oct. 2005.
- CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, July/Aug. 2006.
- CAVALCANTI, F. R. et al. An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosa* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 5, p. 729-738, May 2007.
- CHALFOUN, N. R.; CASTAGNARO, A. P.; DÍAZ RICCI, J. C. Induced resistance activated by a culture filtrate derived from a virulent pathogen as a mechanism of biological control of anthracnose in strawberry. **Biological Control**, Orlando, v. 58, n. 3, p. 319-329, Sept. 2011.
- CHANG, H. T. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource technology**, Essex, v. 99, n. 14, p. 6266–6270, Sept. 2008.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2011, primeira estimativa, janeiro/2011**. Brasília, 2011. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Estatistica/Caf%C3%A9/Informe%20Caf%C3%A9%20-%20Maio-2011.xls > Acesso em: 4 mar. 2011.
- COOPER, R. M. MAMPs-induced defences and How pathogens overcome it. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 5., 2010, Lavras. **Anais...** Lavras, 2010. p. 99-116.

CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 101, n. 3, p. 709-712, Mar. 1993.

COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 150-155, mar./abr. 2007.

DE LORENZO, G. et al. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, n. 11, p. 1521–1528, June 2011.

GORE J.P.; O'GARRO L.W. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from bell pepper and tomato in Barbados undergoes changes in race structure, virulence anti sensitivity to chemical control agents. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.147, n. 7/8, p. 397-402, July 1999.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process biochemistry**, London, v. 38, n. 7, p. 987-996, Feb. 2003.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, 1987.

GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-s-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.1, p.89-94, jan./jun. 2001.

HAHN, M. G.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 68, n. 5, p. 1161-69, Nov. 1981.

HAMMERSCHMIDT, H.; 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, 1997. p. 177-199.

KAYSHAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 215-227, May 2001.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 641-669.

MANICA, I. **Fruticultura tropical 1: maracujá**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 151 p.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 185-190, 1985.

MEDEIROS F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 41, n. 3/4, p. 147-150, Aug./Sept. 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I - bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, July 2000.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: A. BERGAMINI-FILHO, A.; H. KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. p. 417-453.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

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

RESENDE, M. L. V. et al. O papel dos MAMPs na imunidade inata em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 18, p. 1- 50, 2010.

RIDLEY B. L., O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 57, n. 6, p. 929–967, July 2001.

RIVAS, B. et al. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 7, p. 2380-2387, Mar. 2008.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p.1809-1819, Oct. 1996.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SEQUEIRA, L. Mechanisms of induced resistance in plants. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 51-79, Oct. 1983.

SOARES, M. M. C. N. et al. Pectinolytic enzymes production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 79-82, Feb. 2001.

STICHER, L.; MAUCHMANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, Sept. 1997.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 388-394, mar./abr. 2007.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Oct. 1997.

WALTERS, D. et al. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 12, p. 1368-1373, Dec. 2005.

ZAMBOLIM L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: ZAMBOLIM L (Ed.) **O Estado da arte de tecnologias de produção de café**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. p. 369-450.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Extratos de casca de laranja induzem resistência em cafeeiro contra a ferrugem (*Hemileia vastratrix*)

Preparado de acordo com as normas da Tropical Plant Pathology
(versão preliminar)

Kátia V. Xavier, Mário Lúcio V. Resende, Pedro M. Ribeiro Júnior e Daiane F. Miranda.

RESUMO

A indução de resistência, mediada por extratos vegetais, pode ser um método alternativo para o manejo da ferrugem-do-cafeeiro. Extratos vegetais derivados de casca de laranja e maracujá possuem, em sua composição, grande quantidade de pectina. Esta substância pode ser fragmentada mecânica (moagem), física (calor) e/ou enzimaticamente por meio de pectinases produzidas por *Cladosporium cladosporioides*, em oligogalacturonídeos (OGAs), um potente eliciador de resposta de defesa em plantas. O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos de cascas de maracujá e laranja na proteção e na indução de resistência em cafeeiro contra ferrugem. Mudanças de cafeeiro foram pulverizadas com extratos de casca de maracujá (M) e de laranja (L), produzidos com e sem inoculação de *C. cladosporioides* (cc), em duas concentrações, puros (100%) e diluídos (50%). As mudas foram inoculadas com *H. vastatrix*, sete dias após a pulverização. Os extratos L50% + cc, L50%, M50%, L100% e M100% + cc foram eficientes para reduzir a intensidade da doença, proporcionando 86%, 82%, 80%, 65% e 58% de proteção, respectivamente. Em avaliações *in vitro*, observou-se que estes extratos têm baixa toxicidade a *H. vastatrix*. Mudanças de cafeeiro pulverizadas com L50% e L50% + cc apresentaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes, ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A atividade de peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) foi claramente aumentada após inoculação com *H. vastatrix*. Observou-se também aumento no teor de fenóis solúveis totais aos 14 dias após pulverização, tanto em plantas inoculadas quanto não inoculadas. As aplicações foliares dos extratos de casca de laranja conferiram proteção pelo aumento na atividade de algumas enzimas de defesa, possivelmente pelo reconhecimento dos fragmentos indutores de resistência, OGAs, evidenciando, portanto, que houve controle por meio da indução de resistência.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*. *Coffea arábica*. Pectina. Oligogalacturonídeos.

ABSTRACT

The induction of resistance, by plant extracts, can be an alternative method for the management of coffee leaf rust. Plant extracts made of orange and passion fruit peels, as pectin sources. This substance can be fragmented, mechanical (milling), physical (heat) and/or enzymatically using pectinases produced by *Cladosporium cladosporioides* in oligogalacturonídeos (OGAs), a potent elicitor of defense response in plants. This study aimed to evaluate the effect of orange and passion fruit peels in the protection and induction of resistance in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. Coffee seedlings were sprayed with extracts of orange peels (L) and passion fruit peels (M), inoculated and not inoculated with *Cladosporium cladosporioides* (cc), at the concentrations of 100% and 50%. Seven days later, the plants were challenged with a virulent strain of *H. vastatrix*. The extracts L50% + cc, L50%, M50%, L100% and M100% + cc were efficient to decreasing rust severity, providing 86%, 82%, 80%, 65% and 58% protection, respectively. In an *in vitro* assay, we observed that the extracts showed low mycelial growth inhibition of *H. vastatrix*. Coffee seedlings treated with L50% e L50% + cc showed increased in the antioxidant enzymes, APX, SOD, CAT and POX. The PPO and POX activities were clearly induced soon after inoculation with *H. vastatrix*. Plants sprayed with passion fruits extracts also showed a significant increase in the soluble phenolic contents at 14 days after inoculation, plants treated and untreated with the extracts. Foliar applications of orange peels extracts provided protection probably because of the activation of defense enzymes increased, possibly by the recognition of fragments that induce resistance, OGAs. A possible control through the induction of resistance has occurred.

Keywords: *Hemileia vastatrix*. *Coffea arábica*. Pectin. Oligogalacturonídeos.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que ocorrem no cafeeiro, a ferrugem causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* (Berkeley e Broome) é considerada a mais importante (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Os danos ocasionados por esta doença podem atingir até 50% da produção, caso não sejam tomadas medidas de controle adequadas (ZAMBOLIM et al., 2002).

Para o manejo da ferrugem tem sido utilizado o controle químico. Porém, o uso indiscriminado desta prática causa desequilíbrio ambiental e danos à saúde do homem, além de onerar os custos de produção e gerar raças resistentes do patógeno (WALTERS et al., 2005). Atualmente, um dos maiores desafios dos pesquisadores tem sido determinar métodos alternativos para o manejo da ferrugem que sejam eficientes, porém, de baixo impacto ambiental (GUZZO et al., 2001).

Neste cenário destaca-se a indução de resistência, a qual ativa os mecanismos de defesa latentes da própria planta, por meio do tratamento com agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas) (RESENDE et al., 2004; RYALS et al., 1996).

Após o reconhecimento do agente indutor ou eliciador por receptores transmembrânicos ocorre a ativação de genes envolvidos em diversas rotas de defesa, tais como fitoalexinas, lignina e proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), como quitinases, β -1,3-glucanases e peroxidases (LOUWS et al., 2001; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Os extratos vegetais apresentam substâncias bioativas, capazes de disparar reações de defesa nas plantas (SANTOS et al., 2007). Extratos derivados de resíduos da indústria de alimentos têm sido citados como ativadores dos mecanismos de defesa de plantas (BAI et al., 2004).

Extratos de folhas de café, suspensões de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas putida* foram pulverizados em mudas de cafeeiro e reduziram em mais de 77% a infecção causada por *H. vastatrix* (COSTA; ZAMBOLIM; RODRIGUES, 2007). Barguil et al. (2005) observaram que extrato de folhas de café com ferrugem e Ecolife[®], produto à base de polpa cítrica, foram eficazes na redução da severidade de mancha-de-phoma, indicando um possível efeito na indução de resistência. Cavalcanti et al. (2006), utilizando Ecolife[®] na proteção de plantas de tomateiro contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, obtiveram redução de 40% na severidade da mancha-bacteriana.

Pesquisas realizadas com extratos à base de casca de maracujá e laranja, visando o controle de doenças de plantas por meio da indução de resistência, são bastante promissoras. Estas substâncias apresentam alta concentração de pectinas, as quais podem ser fragmentadas, mecânica (moagem), física (calor) e/ou enzimaticamente, em oligogalacturonídeos (OGAs), um potente eliciador de resposta de defesa em plantas (CÔTÉ; HAHN, 1994).

Os OGAs são moléculas que contêm de 2 a 20 resíduos de α -1,4-D-ácido galacturônico, liberadas por ação de pectinases microbianas da parede celular das plantas durante o ataque do patógeno (HAHN; DARVILL; ALBERSHEIM, 1981). Os OGAs, além de serem fonte de carbono para os patógenos, podem também ser reconhecidos pelo hospedeiro, o qual é capaz de resistir à infecção por ativar seus genes de defesa.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de extratos de cascas de maracujá e laranja na proteção de mudas de cafeeiro contra ferrugem, além de avaliar o efeito destes extratos na atividade das enzimas envolvidas na resposta de defesa, quitinases, peroxidases, polifenoloxidasas, superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e fenilalanina amônia-liases, além da deposição de lignina e fenóis solúveis totais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e obtenção do inóculo

Sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Catuaí Vermelho IAC/144, suscetível à ferrugem, foram semeadas em areia esterilizada e irrigadas diariamente, até atingirem o estágio orelha de onça. Para a avaliação do efeito dos tratamentos na severidade da ferrugem, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno (15 x 20 cm) contendo terra, areia e esterco bovino (2:1:1). Para as avaliações bioquímicas, as plântulas no estágio orelha-de-onça foram transplantadas para bandeja de isopor de 72 células contendo substrato comercial (Vida Verde®). As mudas foram mantidas em casa de vegetação, onde foram irrigadas periodicamente e adubadas conforme a recomendação (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999).

Uredósporos de *H. vastatrix* foram coletados a partir de pústulas de folhas de cafeeiros infectados naturalmente, em condições de campo, na região de Lavras, MG. A coleta foi realizada por meio da raspagem dos uredósporos das pústulas com pincel de cerdas macias. As inoculações foram realizadas por meio de pulverização de uma suspensão de $7,5 \times 10^4$ uredósporos viáveis mL^{-1} , na superfície abaxial das folhas. Estas mudas foram mantidas em câmara úmida no escuro por 48 horas.

Fungicida e obtenção dos extratos

Como padrão de controle químico foi utilizado o fungicida à base de triazol e estrobilurina (ciproconazole 80 g L^{-1} e azoxistrobina 200 g L^{-1}), da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., na dose de 1,0 mL por litro de água.

Para a produção dos extratos foram coletados resíduos (cascas) de laranja e maracujá na indústria de suco Frutilavras, Lavras, MG. Os resíduos, constituídos de exocarpo, mesocarpo e endocarpo, foram secos ao sol e moídos

para se obter porções menores e homogêneas. Em ensaios prévios (dados não mostrados), foram definidas as concentrações de 0,2% de pectina da casca de maracujá e 0,1% de casca de laranja, ou seja, 1,37 g de casca de maracujá e 0,5 g de casca de laranja, os quais foram adicionados separadamente em 100 mL de água. Após esterilização em autoclave, foi realizada a inoculação de 1×10^6 conídios mL^{-1} de *Cladosporium cladosporioides*, agente produtor de pectinases (COSTA, 2007). A incubação foi realizada a 25°C, sob agitação (150 rpm), por cinco dias. Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C. Foram preparados também extratos sem a inoculação com *C. cladosporioides*, casca de maracujá e laranja, seguindo o mesmo processo dos extratos inoculados. Nos experimentos foram utilizados os extratos de casca de maracujá (M) e de laranja (L), produzidos com e sem inoculação com *C. cladosporioides* (cc), em duas concentrações, puros (100%) e diluídos (50%).

Avaliação *in vitro* da toxicidade das formulações sobre a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*

As formulações dos extratos de casca de maracujá e laranja (M100, M50, M100 + cc, M50 + cc, L100, L50, L100 + cc e L50 + cc), obtidas conforme descrito anteriormente e o fungicida foram avaliados na germinação de uredósporos de *H. vastatrix*. Foi utilizada também uma testemunha apenas com água. Os experimentos foram realizados em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo 10 mL meio ágar-água (AA) a 2%. Os tratamentos foram espalhados nas placas, nas concentrações pré-estabelecidas e sobre o meio foram depositados 500 μL da suspensão de uredósporos de *H. vastatrix* espalhados com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 25°C, no escuro, por 16 horas e, após esse período, a germinação foi paralisada com a adição de 40 μL de lactoglicerol, com azul de tripan.

As avaliações da percentagem de germinação dos uredósporos foram realizadas em microscópio estereoscópico, tendo sido avaliados 200 uredósporos por placa.

Extratos de casca de maracujá e de laranja na severidade da ferrugem do cafeeiro

Foram realizadas três pulverizações com os extratos de casca de maracujá (M100, M50, M100 + cc e M50 + cc), de laranja (L100, L50, L100 + cc e L50 + cc) e do fungicida em intervalo de 30 dias. As testemunhas foram pulverizadas com água. Sete dias após cada pulverização, foi realizada a inoculação com *H. vastatrix*, conforme descrito anteriormente.

Formam realizadas avaliações da severidade da ferrugem, a partir do surgimento dos primeiros sintomas, em intervalos de 15 dias, utilizando-se a escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). Em seguida, foi calculada a área abaixo da curva de progresso severidade da doença (AACPSD), conforme Shaner e Finney (1977).

Atividade enzimática

Para determinações bioquímicas, mudas de cafeeiro com quatro pares de folhas foram pulverizadas com os dois tratamentos (L50 e L50 + Cc) que apresentaram menor severidade da doença no experimento anterior e uma testemunha pulverizada com água, todos inoculados e não inoculados com *H. vastatrix*. Os tempos de coleta das amostras foliares para a determinação da atividade das enzimas foram de 0, 1, 2, 3, 7, 8 e 10 dias após a pulverização (DAP). Para a determinação dos fenóis solúveis totais e lignina, os tempos de coleta foram de 3 e 14 DAP. A inoculação foi realizada seis dias após a pulverização dos tratamentos, como descrito anteriormente. Após a coleta, as

amostras foram envolvidas em papel alumínio, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C .

Para as análises enzimáticas, cada amostra congelada foi pesada (1 g) e triturada em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionaram-se 6 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 1 mM de EDTA, 1 mM de β -mercaptoetanol e agitou-se por 20 segundos. O extrato obtido foi centrifugado (12.000 g por 15 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C , para posterior análise.

A proteína total do extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina sérica bovina. A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi avaliada pela inibição da redução fotoquímica do azul de nitrotetrazólico (NBT), de acordo com o método de Koshiba (1993). A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada seguindo o método de Havir e McHale (1987), utilizando o coeficiente de extinção molar de $39,4\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, sendo expressa como μmol de H_2O_2 oxidado por miligrama de proteína por minuto. A atividade da ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) foi calculada com base no método de Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção de $2,8\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. A atividade de quitinase (CHI; EC 3.2.1.14) foi avaliada de acordo com a metodologia Wirth e Wolf (1990), utilizando-se o substrato CM-Chitin-RBV e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína por minuto. A atividade de polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1) foi avaliada pela mensuração da conversão do catecol em quinona (GAUILLARD; RICHARD-FORGET; NICOLAS, 1993), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $3.450\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. A atividade de peroxidases de guaiacol (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada seguindo o método de Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991), utilizando o coeficiente de extinção molar de $26,6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ e expressa

como μmol de H_2O_2 oxidado por miligrama de proteína por minuto. A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5) foi medida de acordo com Mori, Sakurai e Sakuta (2001) e os valores foram expressos em μmol de ácido-transcinâmico miligrama de proteína por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $30,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Na análise dos teores de fenóis solúveis e lignina, cada amostra congelada foi triturada em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 16 horas. Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL e homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante (extrato metanólico) foi usado para a determinação dos fenóis solúveis e o resíduo sólido foi usado para determinar a concentração de lignina, como descrito por Rodrigues et al. (2005).

Delineamento experimental e análise dos dados

Para avaliar a eficiência dos extratos na proteção das mudas de cafeeiro, foi utilizado o delineamento de blocos casualizados com 4 repetições e parcela experimental composta por 6 plantas.

O ensaio *in vitro* foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Nas análises dos teores de fenóis solúveis e lignina foi utilizado delineamento de blocos casualizados, com 3 repetições e parcela de 4 plantas por coleta. As médias, quando significativas pelo teste F, para a avaliação da proteção das mudas, ensaio *in vitro* e fenóis solúveis e lignina, foram comparadas pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$), utilizando-se o programa estatístico Sisvar[®] (Ferreira, 2000).

Para as análises enzimáticas, foi utilizado o delineamento de blocos casualizados com 3 repetições e 4 plantas por parcela por coleta. As atividades enzimáticas dos extratos foram comparadas, ao longo do tempo, com as testemunhas inoculadas e não inoculadas.

RESULTADOS

Extratos à base de casca de maracujá e laranja na severidade da ferrugem-do-cafeeiro

Os primeiros sintomas de ferrugem foram observados na superfície abaxial das folhas, 34 dias após a primeira inoculação. Os extratos L50 + cc, L50, M50, L100 e M100 + cc não diferiram estatisticamente entre si nem do fungicida, proporcionando um controle de 86%, 82%, 80%, 65% e 58%, respectivamente, em relação à testemunha. Os demais tratamentos, M100, M50 + cc e L100 +cc, proporcionaram controle de 28%, 26% e 5%, respectivamente, não diferindo da testemunha (Figura 1).

Os testes de germinação de uredósporos *in vitro* indicaram que os extratos apresentaram, em geral, baixa atividade fungistática. Dentre os extratos testados, apenas quatro inibiram germinação em mais de 30%, em relação à testemunha (dados não mostrados).

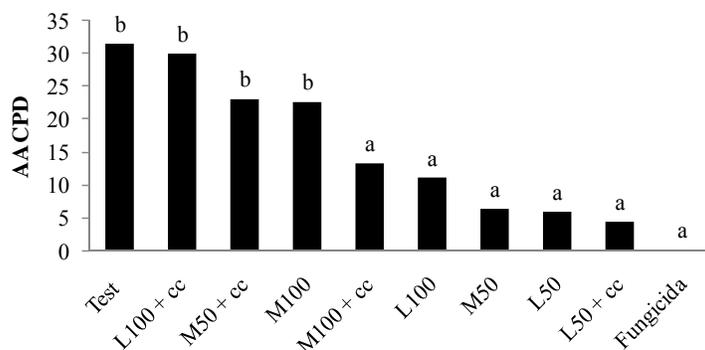


Figura 1 Área abaixo da curva de progresso de severidade da ferrugem (AACPD) em mudas de café cv. Catuaí Vermelho IAC /144. Test. (testemunha pulverizada com água), fungicida (azoxistrobina + ciproconazol) e os extratos de casca: M100 (maracujá a 100%), M50 (maracujá a 50%), M100 + cc (maracujá inoculado com *Cladosporium cladosporioides* (cc) a 100%), M50 + cc (maracujá inoculado com cc a 50%), L100 (laranja a 100%), L50 (laranja a 50%), L100 + cc (laranja inoculada com cc a 100%), L50 + cc (laranja inoculada com cc a 50%). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$)

Extratos à base de casca de maracujá e laranja na atividade das enzimas relacionadas à defesa, à deposição de lignina e a fenóis solúveis totais

Mudas de cafeeiro pulverizadas com o extrato L50 + cc apresentaram atividade da enzima APX maior que a testemunha aos 7 e 8 dias após pulverização (DAP), apresentando produção máxima, cerca de cinco vezes maior que a testemunha, aos 14 DAP (Figura 2A). Mudas inoculadas com *H. vastatrix* apresentaram aumento atividade de APX em relação à testemunha e mostraram pico de atividade também aos 14 DAP (Figura 2A). As mudas de cafeeiro, quando pulverizadas com o extrato L50, apresentaram maior atividade da APX em relação à testemunha de 1 a 7 DAP em plantas não inoculadas. Em plantas inoculadas, essa atividade foi maior a partir de 10 DAP (Figura 2B).

A atividade da enzima catalase (CAT) seguiu um padrão semelhante para os dois extratos, L50 + cc e L50 (Figura 2C e D). Até 3 DAP não foi observado efeito desses tratamentos e nem da testemunha na atividade da CAT. Plantas tratadas com L50 + cc apresentaram máxima atividade da CAT aos 7 DAP, entretanto, após a inoculação com *H. vastatrix*, a atividade da CAT decresceu, apesar de ter se mantido maior que a testemunha (Figura 2C). Mudanças pulverizadas com o extrato L50 após inoculação apresentaram aumento na atividade da CAT, em relação às plantas não inoculadas, com máxima atividade aos 14 DAP (Figura 2D). Em média, o tratamento L50 apresentou maiores níveis da enzima CAT que o tratamento L50 + cc.

Plantas pulverizadas com o extrato L50 + cc, não inoculadas, apresentaram maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em todas as avaliações (Figura 2E), em relação à testemunha pulverizada com água. Mudanças pulverizadas com o extrato L50, inoculadas e não inoculadas com *H. vastatrix*, apresentaram ligeiro aumento na atividade depois de 8 DAP. Nas Figuras 2E e F, observa-se que, em média, os tratamentos L50 e L50 + cc apresentam maior atividade que a testemunha.

Em relação à enzima polifenoloxidase PPO, foi observado que, até a inoculação com *H. vastatrix*, não houve incremento na atividade em nenhuma época de avaliação (Figura 3A e B). No entanto, após a inoculação, a atividade desta enzima aumentou em plantas tratadas com L50, em relação às plantas não inoculadas (Figura 3B).

A atividade de peroxidase (POX) nas plantas pulverizadas com L50 + cc, não inoculadas com *H. vastatrix*, foi maior em todas as coletas, enquanto plantas inoculadas apresentaram menor atividade de POX de 8 a 10 DAP e maior atividade aos 14 DAP, em relação às testemunhas (Figura 3C).

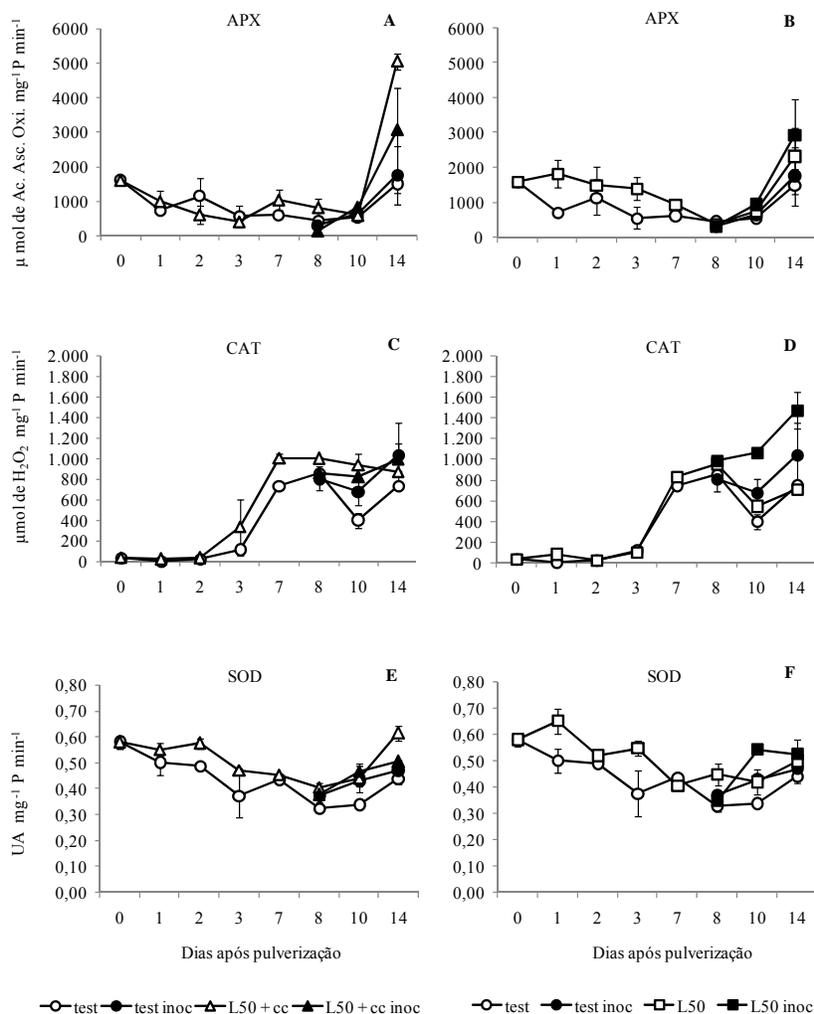


Figura 2 Atividade de ascorbato peroxidase (APX) (μmol de ácido ascórbico oxidado por mg de proteína por minuto), catalase (CAT) (μmol de peróxido de hidrogênio por mg de proteína por minuto) e superóxido dismutase (unidade de atividade por mg de proteína por minuto) em folhas de café cv. Catuai Vermelho IAC/144, após pulverização com L50 + cc (extrato de casca de laranja inoculado com *Cladosporium cladosporioides* a 50%) e L50 (extrato de casca de laranja a 50%), comparados com a testemunha (test.). A inoculação com *Hemileia vastatrix* (inoc) ocorreu aos 6 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão da média

Plantas pulverizadas com L50, não inoculadas, mostraram maior atividade da POX em 1, 3, 7 e 14 DAP, em relação à testemunha (Figura 3D). Para o mesmo tratamento após inoculação (10 e 14 DAP), ocorreu aumento na atividade desta enzima em relação às plantas não inoculadas (Figura 3D).

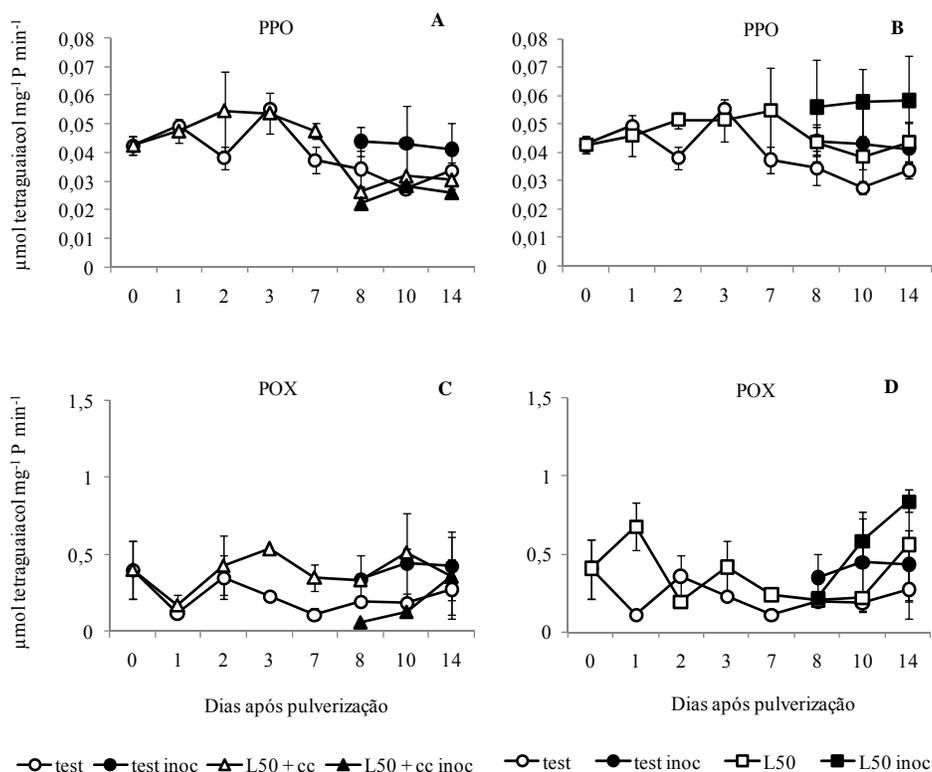


Figura 3 Atividade de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POX) (μmol de tetraguaiacol por mg de proteína por minuto) em folhas de café cv. Catuai Vermelho IAC/144, após pulverização com L50 + cc (extrato de casca de laranja inoculado com *Cladosporium cladosporioides* a 50%) e L50 (extrato de casca de laranja a 50%), comparados com a testemunha (test.). A inoculação com *Hemileia vastatrix* (inoc) ocorreu aos 6 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão da média

Mudas pulverizadas com os extratos L50 + cc e L50, inoculadas e não inoculadas com *H. vastatrix*, não apresentaram aumento na atividade de quitinases (QUI) ao longo das avaliações, exceto para mudas tratadas com L50 sem inoculação aos 14 DAP (Figura 4A e B).

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi maior em plantas pulverizadas com L50 + cc e L50 aos 2 e 3 DAP. Não foi observado efeito da pulverização destes extratos nas demais avaliações, tanto em plantas não inoculadas como em plantas inoculadas (Figura 4C e D). Plantas pulverizadas com extrato L50, inoculadas com *H. vastatrix*, apresentaram máxima atividade aos 10 DAP (Figura 4D).

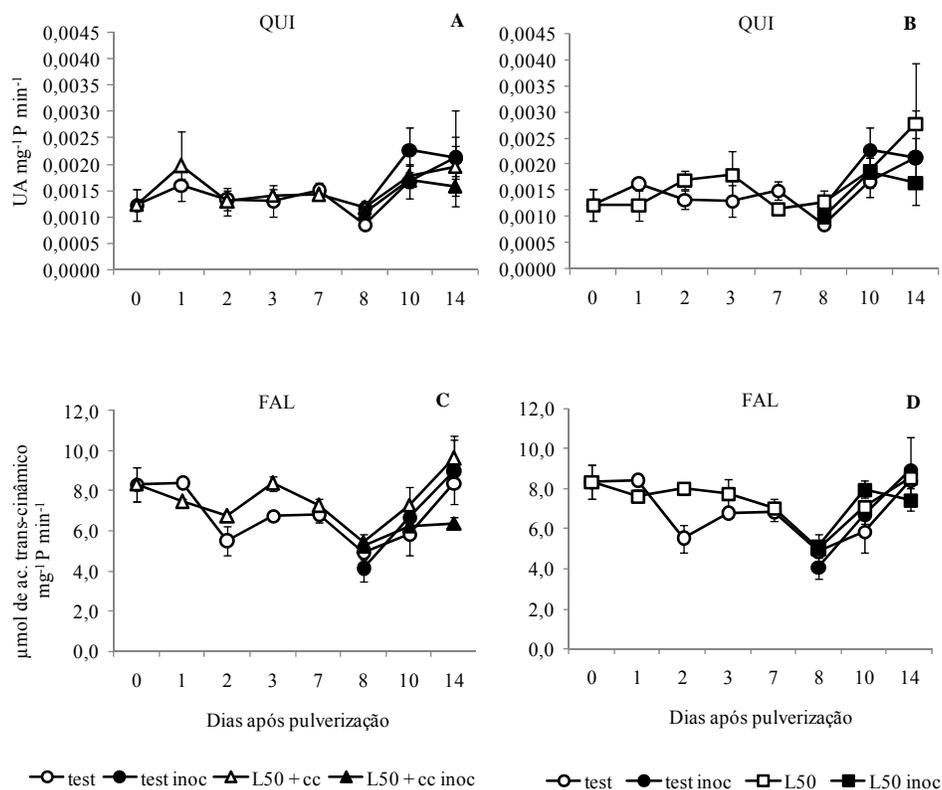


Figura 4 Atividade quitinase (QUI) (unidade de atividade por mg de proteína por minuto) e fenilalanina amônia liases (FAL) (μmol de ácido trans-cinâmico por mg de proteína por minuto) em folhas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho IAC/144, após pulverização com L50 + cc (extrato de casca de laranja inoculado com *Cladosporium cladosporioides* a 50%) e L50 (extrato de casca de laranja a 50%), comparados com a testemunha (test.). A inoculação com *Hemileia vastatrix* (inoc) ocorreu aos 6 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão

Nas avaliações realizadas, aos 3 e 14 DAP, não houve aumento significativo nos teores de lignina nas plantas pulverizadas com L50 e L50 + cc, inoculadas e não inoculadas, em relação à testemunha pulverizada com água (Figura 5A). No entanto, plantas pulverizadas com L50 e L50 + cc e inoculadas com *H. vastatrix*, em média, apresentaram maiores teores de compostos

fenólicos totais, porém, estatisticamente, não diferiram das plantas não inoculadas na avaliação aos 14 DAP (Figura 5A).

Para os teores de fenóis solúveis totais, observa-se que, aos 3 DAP, não houve diferença significativa entre os tratamentos analisados. Contudo, aos 14 DAP foi observado que todos os tratamentos L50 + cc e L50, inoculados e não inoculados, e a testemunha inoculada diferiram estatisticamente das plantas pulverizadas apenas com água e não inoculadas com *H. vastatrix* (Figura 5B).

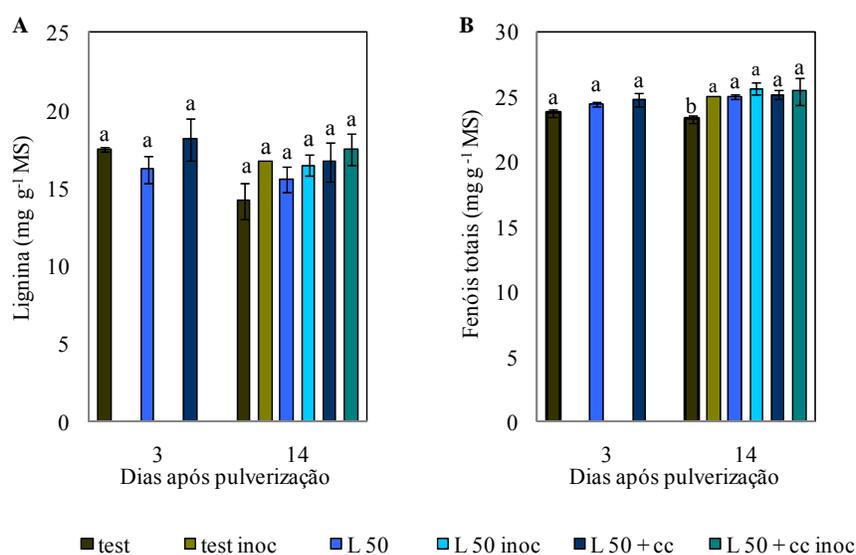


Figura 5 Teores de lignina (mg de lignina por g de matéria seca) e acúmulo de fenóis solúveis (mg de fenóis totais por g de matéria seca) em folhas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho IAC/144, após pulverização com L50 + cc (extrato de casca de laranja inoculado com *Cladosporium cladosporioides* a 50%) e L50 (extrato de casca de laranja a 50%), comparados com a testemunha (test.). A inoculação com *Hemileia vastatrix* (inoc) ocorreu aos 6 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem, pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$)

DISCUSSÃO

Na análise de AACPD, os extratos aquosos de casca de laranja inoculada e não inoculada com *C. cladosporioides* na diluição de 50% foram significativamente eficientes na redução da ferrugem do cafeeiro. Além disso, apresentaram baixa atividade fungistática sobre a germinação dos uredósporos *in vitro*.

Extratos de laranja, na forma do produto comercial Ecolife[®], já foram testados anteriormente contra a mancha-de-phoma do cafeeiro e reduziram a área abaixo da curva de progresso da doença, quando utilizados nas menores dosagens, o que pode ser um indicativo de indução de resistência (BARGUIL et al., 2005). No presente trabalho, foi observado que os extratos de laranja na menor concentração (50%) foram mais eficientes no controle da ferrugem do cafeeiro, em relação aos mesmos tratamentos puros, concordando com os resultados obtidos por Barguil et al. (2005).

De acordo com as informações do fabricante, o produto Ecolife[®], produzido à base de biomassa cítrica, é capaz de exercer efeito protetor e/ou curativo em alguns patossistemas (BARGUIL et al., 2005). Além disso, a biomassa cítrica contém cerca de 40% de substâncias pécticas (RIVAS et al., 2008).

No presente estudo, durante o preparo dos extratos à base de casca de laranja, as substâncias pécticas foram fragmentadas, mecânica (moagem), física (por calor na esterilização) e/ou enzimaticamente (nos extratos produzidos com o *C. cladosporioides*), liberando os oligogalacturonídeos (OGAs), fragmentos indutores de resistência. Os OGAs foram reconhecidos pelas plantas de cafeeiro, as quais podem ter ativado respostas de defesa, proporcionando, dessa forma, altos níveis de controle da ferrugem do cafeeiro.

Hahn, Darvill e Albersheim (1981) utilizaram água quente para a extração de OGAs de células obtidas do tecido intacto de soja. Portanto, o extrato de laranja (L50) sem inoculação com *C. cladosporioides*, liberou os OGAs devido ao aquecimento durante o processo de esterilização, ou seja, ocorreu a quebra física e não enzimática das substâncias pécicas.

Vários autores estudaram a aplicação exógena de OGAs e observaram que estes provocam respostas fisiológicas nos tecidos das plantas nas quais são produzidas as enzimas poligalacturonases (PGs). Exemplo da atividade das PGs foi encontrado em suspensão de células cultivadas de fumo, cenoura e roseira, bem como nos cotilédones de algodão (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001).

Os extratos de casca de laranja, produzidos por meio da inoculação ou não com o fungo *C. cladosporioides*, são ricos em diversos polissacarídeos da parede celular das cascas e, até mesmo, do próprio fungo. Diversos trabalhos utilizando extratos vegetais contendo OGAs não purificados têm atribuído às respostas biológicas aos OGAs, no entanto, estas misturas contêm outros açúcares, além do ácido galacturônico, que podem disparar as respostas de defesa das plantas (CÔTÉ; HAHN, 1994).

Neste trabalho, pulverizações com extratos à base de casca de laranja foram eficientes no controle da ferrugem do cafeeiro porque estes eliciadores de resposta de defesa imitam o ataque do patógeno. Os eliciadores são reconhecidos pelas plantas de café, ativando, assim, suas respostas de defesa, tais como aumento na atividade das enzimas APX, CAT, SOD e POX, além de aumentar o conteúdo de fenóis solúveis totais. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Cavalcanti et al. (2006) que, ao pulverizarem Ecolife® à base de biomassa cítrica em plantas de tomate posteriormente desafiadas com *Xanthomonas vesicatoria*, observaram aumento a atividade das enzimas peroxidases, polifenoloxidasas, glucanases e quitinases e maior deposição de lignina nas folhas de tomateiro.

Os incrementos na atividade das enzimas de defesa, durante o presente estudo, concordam também com os obtidos por Nardi et al. (2006) que, trabalhando com mudas de cafeeiro pulverizadas com eliciadores abióticos, observaram indução da expressão de genes de defesa relacionados à explosão oxidativa e aumento na atividade das enzimas glutathione-S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e lipoxigenase relacionadas com a defesa.

Outro mecanismo de indução de resistência, ativado pelos oligogalacturonídeos, é o aumento na geração de EAOs. Embora possam contribuir para o reforço da resistência a doenças nos tecidos vegetais, alto nível de EAOs pode causar peroxidação lipídica e levar à perda da integridade da membrana do órgão da planta. EAOs nos tecidos vegetais podem ser eliminadas pelo complexo de enzimas antioxidante, SOD, APX e CAT, que atuam eliminando os efeitos nocivos do excesso de H_2O_2 sobre os tecidos (LAMB; DIXON, 1997).

O aumento na atividade de enzimas antioxidantes pode traduzir uma proteção da planta contra ataque do patógeno. Neste estudo foi observado incremento significativo na atividade de APX, CAT e POX, nas plantas pulverizadas com L50 e L50 + cc. Contudo, a enzima antioxidante SOD apresentou decréscimo de atividade ao longo do tempo, isso porque a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as espécies ativas de oxigênio, sendo responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O (GRATÃO et al., 2005). Estes resultados concordam com os obtidos por Zeng et al. (2010), em frutos de laranja tratados com quitosana, componente da parede celular fúngica, e posteriormente desafiadas com *Penicillium* spp., que observaram aumento na atividade das enzimas POX, SOD e APX.

A atividade das outras enzimas antioxidantes APX, CAT e POX foi similar para os dois tratamentos avaliados, porém, houve uma tendência geral de

maior atividade nas folhas tratadas com L50, após as plantas terem sido desafiadas com *H. vastatrix*.

Durante a penetração do patógeno ocorre ruptura dos tilacoides e, dessa forma, é liberada a enzima polifenoloxidase (PPO), a qual apresenta a função de oxidar compostos fenólicos a quinonas, substâncias mais tóxicas aos microrganismos do que o próprio fenol (CARDOSO; GARRAWAY, 1977). Foi observado, neste trabalho, aumento na atividade da PPO após a inoculação com *H. vastatrix* nas plantas previamente pulverizadas com extrato de laranja (L50). Estes resultados concordam com os obtidos por Maxemiuc-Naccache e Dietrich (1985), os quais sugeriram o envolvimento da enzima PPO na resistência do cafeeiro contra o fungo *H. vastatrix*. Em 2008, Amaral e colaboradores estudaram o efeito de indutores na resistência de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* e também observaram aumento na atividade de PPO.

Outra classe de enzimas de defesas são as quitinases (QUI), que atuam na hidrólise da quitina, principal componente da parede celular de fungos, sendo sintetizadas pelas plantas em resposta ao ataque dos patógenos (MAJEAU; TRUDEL; ASSELIN, 1990), o que não foi confirmado no presente trabalho. Após inoculação com o agente desafiador *H. vastatrix*, foi observado que as plantas não inoculadas apresentaram maior atividade de quitinase que as inoculadas. Estes resultados discordam dos relatados por Guerra-Guimarães et al. (2009), ao estudarem atividade da QUI em resposta à infecção com *H. vastatrix*.

A rota dos fenilpropanoides, iniciada pela conversão da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico reação catalisada pela enzima FAL, tem como principal produto a lignina, a qual atua na resposta de defesa das plantas por reforçar as paredes celulares contra a invasão dos patógenos (LAMB et al., 1989). A atividade da FAL foi avaliada e, em geral, antes da inoculação, manteve-se superior nas plantas pulverizadas com L50 e L50 + cc, em relação à testemunha.

Esta tendência de queda na atividade da FAL durante o experimento foi relatada também por Cavalcanti et al. (2006) em plantas de tomateiro desafiadas com *Xantomonas vesicatoria*.

Os aumentos obtidos na deposição de lignina aos 14 DAP, no presente estudo, concordam com os aumentos observados por Santos et al. (2007), em plantas de cafeeiro pulverizadas com extrato de casca de fruto de café, extrato de folha de café com ferrugem e extrato ramos de lobeira infectada com *Crinipellis perniciosa*.

Foi observado aumento significativo nos fenóis solúveis totais aos 14 DAP, para os dois tratamentos avaliados, L50 e L50 + cc, tanto para as plantas inoculadas quanto as não inoculadas em relação à testemunha. De acordo com Cohen, Gisi e Niederman (1993), a maioria dos estudos indica que a acumulação de fenóis precede a lignificação. Portanto, pode-se inferir que, no presente estudo, uma posterior lignificação poderia ocorrer e, assim, aumentar a defesa da planta contra infecção do patógeno, pois foi observado um aumento significativo nos compostos fenólicos aos 14 DAP.

Segundo Resende et al. (2010), a quebra enzimática das substâncias pécnicas presentes nos resíduos é um entrave para a produção em larga escala dos OGAs. Portanto, no presente trabalho, tanto extrato de casca de laranja produzido com inoculação de *C. cladosporioides* (L50 + cc) quanto o produzido na ausência deste fungo (L50), foram eficientes na redução da severidade da ferrugem. Provavelmente, a quebra da pectina ocorreu pelo aquecimento durante o processo de esterilização dos extratos (121° C 20 min.⁻¹).

Os resultados desse trabalho indicam que a aplicação foliar de L50 + cc e L50 disparou as respostas de defesa do cafeeiro, possivelmente por reconhecimento dos OGAs. Porém, outras moléculas podem ter atuado como eliciadoras das respostas de defesa, uma vez que os extratos são uma mistura de polissacarídeos da parede celular de casca de laranja. Além disso, os extratos

produzidos pelo cultivo do agente produtor de pectinases, *C. cladosporioides*, podem conter constituintes da parede celular fúngica. Assim, outros polissacarídeos podem estar envolvidos na ativação das respostas de defesa e, dessa forma, na redução da severidade da ferrugem e deverão ser elucidados futuramente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D. R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*, **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 425-431, dez. 2008

BAI, Z. H. et al. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. **Bioresource Technology**, Essex, v. 95, n. 1, 49-52, Oct. 2004.

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, Sept./Oct. 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-54, May 1976.

CARDOSO, C. O. N.; GARRAWAY, M. O. Bioassay using phenolic compounds and phytoalexins produced in bean plants infected with *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder & Hans. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 3, n. 2, p. 103-116, Apr./June 1977.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, July/Aug. 2006.

COHEN, Y.; GISI, U.; NIEDERMAN, T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl-ester. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 10, p. 1054-1062, Oct. 1993.

COSTA, L. M. A. S. **Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico G088**. 2007. 81 f. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 150-155, mar./abr. 2007.

CÔTÉ, F.; HAHN, M. G. Oligosaccharins: structure and signal transduction. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 5, p. 1379–1411, Dec. 1994.

CUNHA, R. L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Vitória: Embrapa Café, 2001. p. 77-78.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. P. 255-258.

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 215, n. 1, p. 59-65, Nov. 1993.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, n. 4, p. 702-706, Dec. 2009.

GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-s-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.1, p.89-94, jan./jun. 2001.

HAHN, M. G.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 68, n. 5, p. 1161-69, Nov. 1981.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 84, n. 2, p. 450–455, June 1987.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, n. 5, p. 713–721, July 1993.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251–275, June 1997.

LAMB, C. J. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v. 56, n. 2, p. 215–22, Jan. 1989.

LOUWS, F. J. et al. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, May 2001.

MAJEAU, N.; TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. **Plant Science**, Limerick, v. 68, n. 1, p. 9-16, 1990.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 185-190, 1985.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 2, p. 355–360, Jan. 2001.

NAKANO, Y.; ASADA, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867–880, Aug. 1981.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594–1605, Dec. 2006.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: A. BERGAMINI-FILHO, A.; H. KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. p. 417-453.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costaricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 2004, Elsinore. **Proceedings...** Elsinore: Universitas Friburgensis, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V. et al. O papel dos MAMPs na imunidade inata em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 18, p. 1- 50, 2010.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. 359 p.

RIDLEY B. L., O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-relate signaling. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 57, n. 6, p. 929–967, July 2001.

RIVAS, B. et al. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 7, p. 2380-2387, Mar. 2008.

RODRIGUES, F. A. et al. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, n. 4, p. 144–159, Apr. 2005.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p.1809-1819, Oct. 1996.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, Aug. 1977.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 13, n. 1, p. 43–50, 1991.

WALTERS, D. et al. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 12, p. 1368-1373, Dec. 2005.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, Dec. 1990.

ZAMBOLIM L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: ZAMBOLIM L (Ed.) **O Estado da arte de tecnologias de produção de café**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. p. 369-450.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças Do Cafeeiro (C. Arabica e C. Canephora), In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p.165-180.

ZENG, K. et al. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 223–228, Sept. 2010.

ARTIGO 2

**Extratos de casca de maracujá induzem resistência em tomateiro contra a
mancha-bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*)**

Preparado de acordo com as normas da Tropical Plant Pathology
(versão preliminar)

Kátia Viana Xavier, Mário Lúcio V. Resende, Pedro M. Ribeiro Júnior, Daiane
Franciele Miranda.

RESUMO

Visando desenvolver um método alternativo para o manejo da mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria*, extratos de cascas de laranja e maracujá, fontes promissoras de oligogalacturonídeos, foram testados na proteção do tomateiro. Foi avaliado, ainda, o potencial desses extratos em ativar enzimas de defesa do tomateiro, bem como alterar os teores de lignina, fenóis solúveis totais e clorofila. Mudanças de tomateiro foram pulverizadas com extratos de casca de maracujá (M) e de laranja (L), produzidos com e sem inoculação de *C. cladosporioides* (cc), em duas concentrações, puros (100%) e diluídos (50%). As mudas foram inoculadas com *X. vesicatoria* quatro dias após a primeira pulverização. No experimento *in vitro*, nenhum extrato inibiu o crescimento da bactéria. Os extratos M50 + cc e M50 proporcionaram 73% e 81% de proteção, respectivamente, em relação à testemunha pulverizada com água, não diferindo estatisticamente do indutor de resistência ASM. Os mesmos extratos apresentaram aumento significativo nos teores de clorofila, em relação à testemunha inoculada. Mudanças de tomate pulverizadas com M50 e M50 + cc apresentaram aumento na atividade das enzimas de defesa, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO), fenilalanina amônia liases (FAL), em relação às testemunhas pulverizadas com água. Foi observado aumento no teor de lignina aos 14 dias após pulverização dos extratos e também do ASM. Os resultados sugerem que os extratos de casca de maracujá induziram resistência em tomateiro contra *X. vesicatoria*, pela ativação de enzimas de defesa. Além disso, plantas pulverizadas com estes extratos não apresentaram alterações nos teores de clorofila em relação à testemunha não inoculada.

Palavras-chave: Controle alternativo. Oligogalacturonídeos. *Xanthomonas vesicatoria*. Enzimas de defesa.

ABSTRACT

With the aim of developing an alternative method for the control of bacterial spot of tomato, caused by *Xanthomonas vesicatoria*, extracts of orange and passion fruit's peels, promising sources of oligogalacturonides (OGAs), were evaluated in the protection of tomato plants. We also assess the potential of these extracts in the activating of defense enzymes, the lignin deposition, and the content of soluble phenolic compounds and chlorophyll in the leaf tissues. Plants were sprayed with extracts of orange's peels (L) and passion fruit's peels (M), inoculated and not inoculated with *Cladosporium cladosporioides* (cc), at the concentrations of 100% and 50%. Four days later, the plants were challenged with a virulent strain of *X. vesicatoria*, under greenhouse conditions. In the *in vitro* study, none of the tested extracts showed an inhibitory effect upon *X. vesicatoria* growth. The extracts M50 + cc and M50 provided 73% e 81% of protection respectively, in comparison with water-pre-treated controls, but did not differ statistically from the ASM, a commercial inducer of resistance. These extracts also showed a significant increase in the contents of chlorophyll, in comparison with control treatments. Tomato plants sprayed with M50 + cc and M50 were observed to have enhanced PAL, POX, PPO, SOD, CAT and APX enzyme activities, in comparison to water sprayed control. We also observed increased in the lignin depositions 14 days after extracts and ASM were sprayed. Our results suggest that the extracts of passion fruit's peels induced resistance in tomato against *X. vesicatoria* by the activation of defense enzymes. Furthermore, plants treated with passion fruit's peels did not alter the chlorophyll contents in comparison with the controls not inoculated.

Keywords: Alternative control. Oligogalacturonides. *Xanthomonas vesicatoria*. Defense enzymes.

INTRODUÇÃO

A mancha-bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) (Vauterin et al., 1995), resulta em lesões foliares, desfolha, lesões nos frutos, além de perdas consideráveis na produtividade e na qualidade comercial do fruto (LOUWS et al., 2001). Esta bacteriose é considerada uma das doenças de maior importância econômica no tomateiro, sendo disseminada em praticamente todas as regiões produtoras de tomate.

A falta de produtos químicos eficazes para o manejo das doenças bacterianas do tomateiro e a resistência destas bactérias a antibióticos, como o sulfato de estreptomicina, e produtos à base de cobre estimularam o surgimento de esforços para desenvolver estratégias alternativas de manejo de doenças causadas por este tipo de patógeno nesta cultura (GORE; GARRO, 1999). Dentre estas estratégias, destaca-se a indução de resistência, que é caracterizada pela ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta em resposta a eliciadores abióticos e bióticos (STICHER; MAUCHMANI; METRAUX, 1997).

Durante a penetração dos patógenos no tecido vegetal ocorre a degradação enzimática da parede celular e, dessa forma, são liberados fragmentos indutores de resistência, como oligogalacturonídeos (OGAs). Estas moléculas contêm de 2 a 20 resíduos de α -1,4-D-ácido galacturônico e atuam ativando genes de defesa da planta contra patógenos (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001). As respostas de defesa podem envolver a síntese de moléculas relacionadas à defesa, tais como espécies ativas de oxigênio (EAO) (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006), fitoalexina e proteínas relacionadas à patogênese (Field et al., 2006). A aplicação exógena de OGAs em dicotiledôneas estimula a produção de EAO e induz a ativação catalítica de fenilalanina amônia-liase, primeira enzima da rota dos fenilpropanoides, levando à produção

de fitoalexina e lignina (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

O desenvolvimento de formulações à base de extratos vegetais capazes de ativar respostas de defesa introduz uma nova abordagem no manejo de doenças bacterianas (LOUWS et al., 2001). Os extratos apresentam em sua constituição moléculas eliciadoras capazes de induzir resistência em plantas e, conseqüentemente, reduzir a intensidade de várias doenças. Dentre as formulações à base de extratos vegetais citadas na literatura, o extrato de folhas de café (NEFID), rico em eliciadores bióticos, reduziu a severidade da mancha-bacteriana do tomateiro em 65% (MEDEIROS et al., 2009).

Resíduos da indústria de sucos, ricos em pectina, são fontes promissoras de eliciadores bióticos, como os OGAs. A pectina, um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, pode ser fragmentada por meio de enzimas pectinolíticas, produzidas por leveduras, bactérias e uma grande variedade de fungos, como o *Cladosporium cladosporioides* (COSTA, 2007).

Em razão da importância da mancha-bacteriana para a cultura do tomateiro e do efeito potencial dos oligogalacturonídeos na indução de resistência, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito protetor e indutor de resistência de extratos à base de cascas de maracujá e laranja em tomateiro contra a mancha-bacteriana, avaliar a atividade de enzimas envolvidas em respostas de defesa em plantas e os teores de lignina e fenóis solúveis totais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e obtenção do inóculo

Sementes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, suscetível à mancha-bacteriana, foram semeadas em bandejas de isopor de 96 células contendo substrato comercial (Vida Verde®). Para avaliação do efeito dos tratamentos na severidade da mancha-bacteriana, as mudas foram transplantadas para potes de 5 litros contendo o mesmo substrato, 25 dias após emergência. Para as avaliações bioquímicas, as sementes foram semeadas diretamente nos potes de 5 litros, contendo o mesmo substrato comercial. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas periodicamente e adubadas conforme a recomendação (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999).

Para a obtenção do inóculo, *X. vesicatoria* foi isolada de folhas de tomateiro com sintomas de mancha-bacteriana, coletadas na região de Lavras, MG. O isolamento foi realizado em meio 523 de Kado e Heskett (1970) (MB1) pela técnica de estrias paralelas. Posteriormente, a bactéria foi repicada para placas contendo o mesmo meio e incubadas a 28°C, durante 12 horas, para o preparo das suspensões bacterianas. Para as inoculações, a concentração da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540} = 0,20$, correspondendo a aproximadamente 10^{11} UFC L⁻¹.

As plantas de tomate, 20 dias após o transplante, foram colocadas em câmara úmida por 12 horas, antes da inoculação. Após esse período, a inoculação foi realizada via pulverização foliar da suspensão bacteriana. Após inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida a 28°C, por um período de 24 horas.

Indutor de resistência comercial e obtenção dos extratos

Foi utilizado o indutor de resistência comercial acibenzolar-S-metil (50% de ASM, produto comercial Bion[®]) da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, na dose de 0,1 g por litro de água.

Para a produção dos extratos, foram coletados resíduos (cascas) de laranja e maracujá, na indústria de suco Frutilavras, Lavras, MG. Os resíduos, constituídos de exocarpo, mesocarpo e endocarpo, foram secos ao sol e moídos para se obter porções menores e homogêneas. Em ensaios prévios (dados não mostrados) foram definidas as concentrações de 0,2% de pectina da casca de maracujá e 0,1% de casca de laranja, ou seja, 1,37 g de casca de maracujá e 0,5 g de casca de laranja, os quais foram adicionados separadamente em 100 mL de água. Após esterilização em autoclave, foi realizada a inoculação de 1×10^6 conídios mL⁻¹ de *Cladosporium cladosporioides*, agente produtor de pectinases (COSTA, 2007). A incubação foi realizada a 25°C, sob agitação (150 rpm), por cinco dias. Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C. Foram preparados também extratos de casca de maracujá e de laranja sem a inoculação com *C. cladosporioides*, seguindo o mesmo processo dos extratos inoculados com este fungo.

Nos experimentos foram utilizados os extratos de casca de maracujá (M) e de laranja (L), produzidos com e sem inoculação com *C. cladosporioides* (cc), em duas concentrações, puros (100%) e diluídos (50%).

Avaliação *in vitro* da toxicidade das formulações sobre *Xanthomonas vesicatoria*

As formulações dos extratos de casca de maracujá e de laranja obtidos conforme descrito anteriormente e ASM foram avaliados no crescimento de *X. vesicatoria*. Utilizou-se sulfato de estreptomicina 1.000 ppm como padrão de controle e água esterilizada como testemunha. Os experimentos foram realizados

em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo 10 mL do meio MB1, sobre o qual foi plaqueado 0,1 mL da suspensão ($A_{540} = 0,20$) de *X. vesicatoria*. Em seguida, 10 µl de cada tratamento foram adicionados em quatro pontos sobre o meio MB1. As placas foram incubadas a 28°C e os halos de inibição foram avaliados 48 horas após a incubação.

Extratos de casca de maracujá e de laranja na severidade da mancha-bacteriana

Plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada, 20 dias após transplante, foram pulverizadas a cada 7 dias com os extratos de casca de maracujá (M100, M50, M100 + cc e M50 + cc), de laranja (L100, L50, L100 + cc e L50 + cc) e ASM. As testemunhas foram pulverizadas com água. Quatro dias após a primeira pulverização, foi realizada a inoculação com *X. vesicatoria*, conforme descrito anteriormente.

Foram realizadas cinco avaliações da severidade da doença por meio da adaptação da escala de notas baseada em Sidhu e Webster (1977). A quantificação da doença foi feita por meio de análise visual convertida em percentagem de severidade, seguindo-se uma escala (1-4) de área lesionada: 1: 0%-25% da área foliar lesionada; 2: 26%-50% da área foliar lesionada; 3: 51%-75% da área foliar lesionada e 4: >75% da área foliar lesionada. A área abaixo da curva de progresso de severidade da doença (AACPD) foi calculada conforme Shaner e Finney (1977).

Extratos à base de casca de maracujá e laranja nos teores de clorofila a, b e total

O teor de clorofila foi determinado em oito folhas por parcela (média de quatro leituras por folha) localizadas na porção mediana da planta, utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502 (*Soil Plant Analysis Development*),

Minolta Camera Co. Ltd., Japão. Foi utilizada uma curva padrão segundo Arnon (1949). As amostras foliares (2 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em frascos de vidro contendo 10 mL de acetona 80%, protegidos da luz. Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 663 e 645 nm para clorofilas a e b, respectivamente. A concentração de clorofila *a* foi obtida pela fórmula $((12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) \times V \times 1000 \text{ MF})$ e a de clorofila b, pela fórmula $((22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) \times V \times 1000 \text{ MF})$, segundo Whitham, Blaydes e Devlin (1971), em que *A* é a absorbância, *V* é o volume final de extrato (10 mL) e MF é a massa fresca, em gramas. O teor de clorofila total foi obtido pela fórmula $((20,2 \times A_{645}) + (8,02 \times A_{663}) \times V \times 1000 \text{ MF})$. Os valores foram expressos em $\mu\text{mg g}^{-1}$ tecido fresco.

Atividade enzimática

Para as determinações bioquímicas, plantas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, 30 dias após a semeadura, foram pulverizadas com os dois tratamentos (M50 e M50 + cc) que apresentaram menor severidade da doença no experimento anterior, uma testemunha pulverizada com água e ASM, na dose de $0,1 \text{ g L}^{-1}$, todos inoculados e não inoculados com *X. vesicatoria*. Os tempos de coleta das amostras foliares para a determinação das atividades enzimáticas foram de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 dias após as pulverizações (DAP). Para a determinação dos fenóis solúveis totais e lignina, os tempos de coleta foram de 3 e 14 DAP. A inoculação com a suspensão de *X. vesicatoria* foi realizada quatro DAP, como descrito anteriormente. Após a coleta, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , para posterior determinação bioquímica.

Para as análises enzimáticas, cada amostra congelada foi pesada (1 g) e triturada em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionaram-se 6 mL de tampão acetato de sódio 50 mM

pH 5,2 e agitou-se por 20 segundos. O extrato obtido foi centrifugado (12.000 g por 15 minutos a 4 °C) e o sobrenadante coletado e armazenado, a -80 °C, para posterior análise enzimática.

A proteína total do extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina sérica bovina. A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi avaliada pela inibição da redução fotoquímica do azul de nitrotetrazóico (NBT), de acordo com o método de Koshiba (1993). A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada seguindo o método de Havir e McHale (1987), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa como μmol de H₂O₂ oxidado por miligrama de proteína por minuto. A atividade de polifenoloxidasas (PPO) pela mensuração da conversão do catecol em quinona (GAUILLARD; RICHARD-FORGET; NICOLAS, 1993), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 3450 M⁻¹ cm⁻¹. A atividade de peroxidases de guaiacol (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada seguindo o método de Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa como μmol de H₂O₂ oxidado por miligrama de proteína por minuto. A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5) foi medida de acordo com Mori, Sakurai e Sakuta (2001) e os valores expressos em μmol de ácido transcinâmico miligrama de proteína por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 30,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

Para analisar os teores de fenóis solúveis e lignina, cada amostra congelada foi triturada em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 16 horas. Alíquotas de 30 mg do material liofilizado foram transferidas para microtubos de 2 mL e homogeneizadas com 1,5 mL de metanol a 80% e mantidas sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g, por 10 minutos,

a 4°C. O sobrenadante (extrato metanólico) foi utilizado para a determinação dos fenóis solúveis e o resíduo sólido, para determinar a concentração de lignina como descrito por Rodrigues et al. (2005).

Delineamento experimental e análise dos dados

A eficiência dos extratos aquosos de casca de laranja e de maracujá na proteção das mudas de tomateiro foi avaliada utilizando-se o delineamento em blocos casualizados com 4 repetições e parcela experimental composta por 4 plantas.

O ensaio *in vitro* foi verificado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Para as análises dos teores de fenóis solúveis e lignina nas folhas da mudas de tomateiro foi utilizado delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições e parcela de 4 plantas por coleta. As médias, quando significativas pelo teste F, para a avaliação da proteção das mudas, ensaio *in vitro* e fenóis solúveis e lignina, foram comparadas pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$), utilizando-se o programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2000).

Para as análises enzimáticas, foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições e 4 plantas por parcela por coleta. As atividades enzimáticas dos extratos foram comparadas ao longo do tempo com as testemunhas inoculadas e não inoculadas.

RESULTADOS

Extratos à base de casca de maracujá e laranja na severidade da mancha bacteriana do tomateiro

Todos os extratos avaliados proporcionaram controle da mancha bacteriana do tomateiro, pois diferiram estatisticamente da testemunha. Os extratos de casca de maracujá M50 + cc e M50 foram os mais eficientes em reduzir a severidade da doença. Estes extratos apresentaram controle de 73% e 81%, respectivamente, em relação à testemunha pulverizada com água e não diferiram estatisticamente do padrão de indução de resistência ASM (82% de controle), nem da testemunha absoluta. Os extratos L50, M100, M100 + cc, L100, L100 + cc e L50 + cc promoveram redução intermediária da mancha bacteriana do tomateiro em relação à testemunha, com controle variando de 52% a 62%.

Os testes *in vitro* sobre o crescimento de *X. vesicatoria* indicaram que nenhum extrato inibiu o crescimento da bactéria. O único tratamento que proporcionou halo inibitório foi o padrão sulfato de estreptomicina (dados não mostrados).

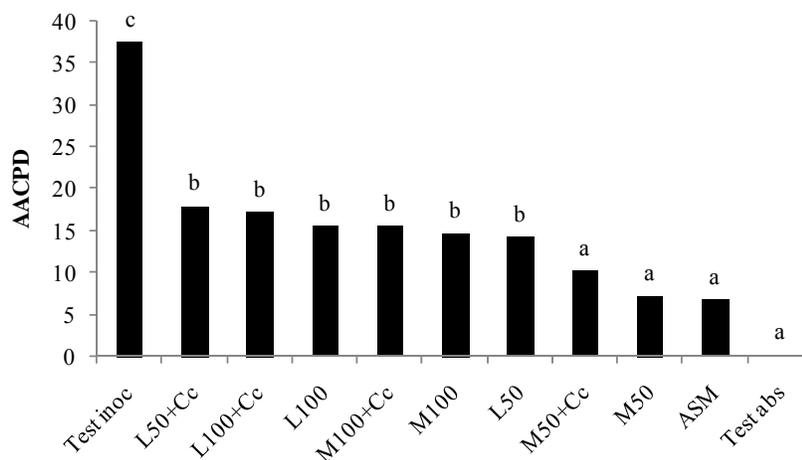


Figura 1 Área abaixo da curva de progresso de severidade (AACPD) da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* em tomate cv. Santa Cruz Kada. Test. (testemunha pulverizada com água e inoculada), test abs (testemunha pulverizada com água não inoculada), ASM (acibenzolar-S-metil 0,2g L⁻¹) e os extratos de casca: M100 (maracujá a 100%), M50 (maracujá a 50%), M100 + cc (maracujá inoculado com *Cladosporium cladosporioides* (cc) a 100%), M50 + cc (maracujá inoculado com cc a 50%), L100 (laranja a 100%), L50 (laranja a 50%), L100 + cc (laranja inoculada com cc a 100%), L50 + cc (laranja inoculada com cc a 50%). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$)

Extratos à base de casca de maracujá e laranja nos teores de clorofila *a*, *b* e total

Durante o período de avaliação da severidade da mancha-bacteriana do tomateiro foi avaliado também o efeito dos tratamentos nos teores de clorofila *a*, *b* e total (Figura 2A, B e C). Na primeira avaliação (2 DAS), a testemunha absoluta apresentou maiores teores de clorofila *a*, *b* e total, em relação aos demais tratamentos. Aos 4 DAS, os extratos M50, M50 + cc e L50 foram os que apresentaram os maiores teores de clorofila *a* e *b*, em relação à testemunha inoculada e não diferiram da testemunha absoluta. Quanto ao conteúdo de

clorofila total, não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos e testemunhas (Figura 2C).

Na terceira avaliação (6 DAS), observou-se que houve diferença significativa para os teores de clorofilas *a*, *b* e total. Sendo assim, os extratos M50, M50 + cc e L100 foram superiores no acúmulo de clorofila, não diferindo da testemunha sadia, porém, diferiram da testemunha da inoculada. Aos 8 DAS, observou-se ligeira queda nos teores de clorofila *a*, *b* e total, no entanto, com diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha. Nesta avaliação, o extrato M50 se destacou por apresentar maiores teores de clorofila *a*, *b* e total.

Na última avaliação realizada (10 DAS), a diferença entre os teores de clorofila *a*, *b* e total não foram significativas. Todavia, a testemunha absoluta manteve os maiores teores de clorofila, seguida por L50, M50 e M50 + cc.

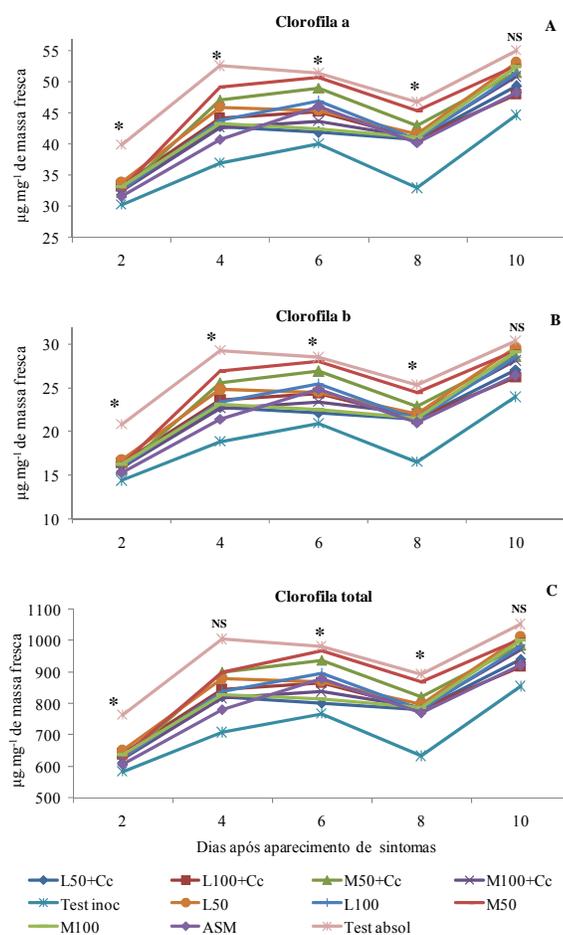


Figura 2 Teor de clorofila *a*, *b* e total (μg de clorofila por mg tecido fresco) em folhas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria*, aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após aparecimentos de sintomas de mancha bacteriana. Test inoc (testemunha pulverizada com água e inoculada), test abs (testemunha pulverizada com água não inoculada), ASM (acibenzolar-S-metil $0,2\text{g L}^{-1}$) e os extratos de casca: M100 (maracujá a 100%), M50 (maracujá a 50%), M100 + cc (maracujá inoculado com *Cladosporium cladosporioides* (cc) a 100%), M50 + cc (maracujá inoculado com cc a 50%), L100 (laranja a 100%), L50 (laranja a 50%), L100 + cc (laranja inoculada com cc a 100%), L50 + cc (laranja inoculada com cc a 50%). NS e * indicam avaliações com e sem diferença estatística significativa, respectivamente, a 5%, pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$)

Extratos à base de casca de maracujá e laranja na atividade das enzimas relacionadas à defesa, deposição de lignina e fenóis solúveis totais

No ensaio avaliando a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), observa-se que plantas pulverizadas com M50 + cc e inoculadas com *X. vesicatoria* apresentaram máxima atividade aos 7 dias após pulverização (DAP) (Figura 3A). Em plantas pulverizadas com M50, a atividade da enzima SOD aumentou significativamente aos 6 DAP, em relação às plantas não inoculadas com a bactéria e em relação à testemunha pulverizada com água (Figura 3B). Aspecto semelhante foi observado em plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com *X. vesicatoria*, pois estas apresentaram maior atividade 6 DAP, em relação aos controles não inoculados e à testemunha (Figura 3C).

Plantas de tomateiro pulverizadas com M50 + cc, M50 e ASM, sem inoculação com *X. vesicatoria*, apresentaram maior atividade de catalase (CAT) em todas as avaliações em relação às plantas pulverizadas com água (Figura 3D, E e F). Após inoculação, plantas pulverizadas com M50 e ASM apresentaram aumento na atividade enzimática em relação aos respectivos controles não inoculados. O mesmo não ocorreu para o tratamento M50 + cc, pois, aos 6 DAP, verifica-se que a atividade da CAT foi maior para plantas não inoculadas (Figura 3D, E e F).

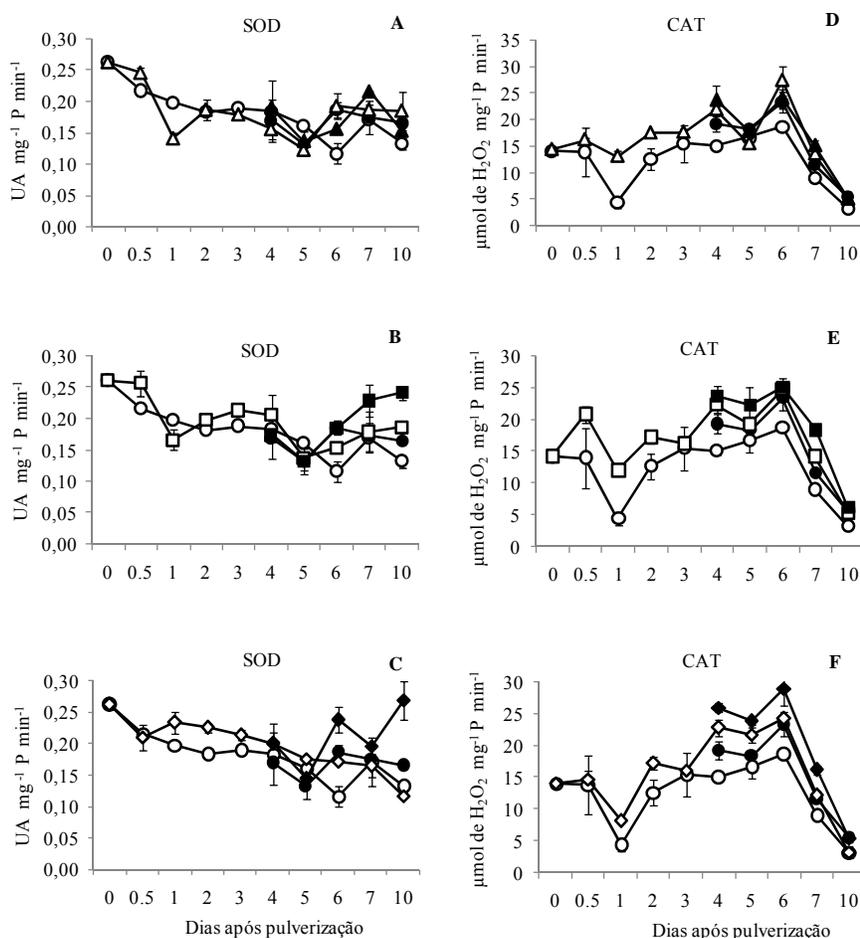


Figura 3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) (unidade de atividade por mg de proteína por minuto) e catalase (CAT) (μmol de peróxido de hidrogênio por mg de proteína por minuto) em folhas de tomate cv. Santa Cruz Kada, suscetíveis a *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) após pulverização com água (testemunha, $-\circ-$), água e inoculada com Xv (testemunha, $-\bullet-$), extrato de casca de maracujá 50% ($-\square-$), extrato de casca de maracujá 50% inoculado com Xv ($-\blacksquare-$), ASM ($-\diamond-$), ASM inoculado com Xv ($-\blacklozenge-$), extrato de casca de maracujá cultivado com *Cladosporium cladosporioides* a 50% ($-\Delta-$), extrato de casca de maracujá cultivado com *C. cladosporioides* a 50% inoculado com Xv ($-\blacktriangle-$). A inoculação com Xv ocorreu aos 4 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão da média

Nas análises da atividade de peroxidase (POX), plantas pulverizadas com M50 e M50 + cc até 3 DAP não diferiram das testemunhas pulverizadas com água. No entanto, após a inoculação ocorreu um incremento significativo na atividade da POX em relação às respectivas testemunhas (Figura 4D e E). Para as plantas pulverizadas com ASM, não inoculadas, observou-se, logo no primeiro dia, aumento na atividade da enzima POX em relação a plantas pulverizadas com água. Entretanto, nas plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com *X. vesicatoria*, o aumento significativo na atividade da POX, em relação a plantas não inoculadas e à testemunha pulverizada com água (Figura 4F), ocorreu após a inoculação

Plantas tratadas com os extratos M50, M50 + cc e ASM, 12 horas após pulverização, apresentam pico de atividade da enzima polifenoloxidase (PPO). Contudo, a atividade desta enzima não se manteve constante para nenhum dos tratamentos (Figura 4D, E e F). Plantas pulverizadas com M50, M50 + cc inoculadas com *X. vesicatoria* apresentaram atividade máxima aos 4 e 5 DAP (Figura 4D e E) e plantas pulverizadas com ASM, aos 5 e 7 DAP (Figura 4F).

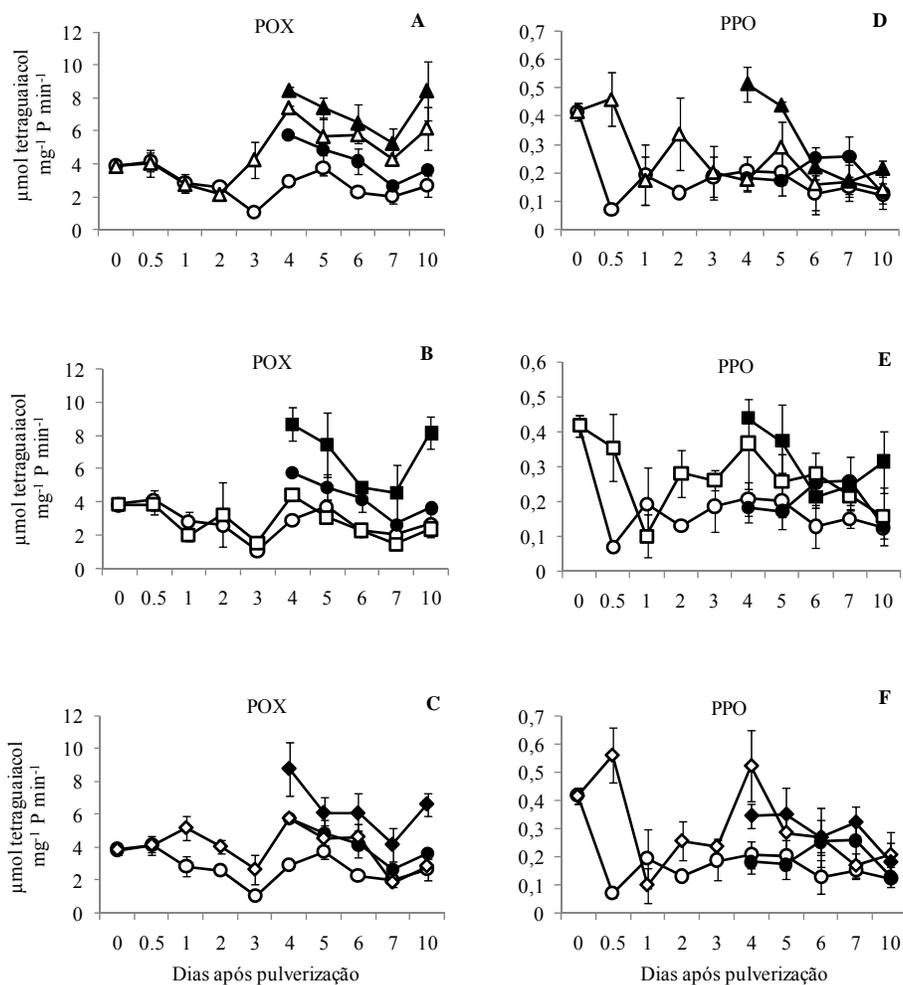


Figura 4 Atividade de peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) (μmol de tetraguaiacol por mg de proteína por minuto) em folhas de tomate cv. Santa Cruz Kada, suscetíveis a *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) após pulverização com água (testemunha, \circ -), água e inoculada com Xv (testemunha, \bullet -), extrato de casca de maracujá 50% (\square -), extrato de casca de maracujá 50% inoculado com Xv (\blacksquare -), ASM (\diamond -), ASM inoculado com Xv (\blacklozenge -), extrato de casca de maracujá cultivado com *Cladosporium cladosporioides* a 50% (Δ -), extrato de casca de maracujá cultivado com *C. cladosporioides* a 50% inoculado com Xv (\blacktriangle -). A inoculação com Xv ocorreu aos 4 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão da média

Antes da inoculação com *X. vesicatoria*, nenhum dos tratamentos testados provocou aumento da atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) (Figura 5A, B e C). Plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com a bactéria apresentaram maior atividade dos 6 aos 10 DAP, em relação às plantas não inoculadas e às pulverizadas com água (Figura 5C). Plantas pulverizadas com os extratos M50 e M50 + cc e inoculadas apresentaram máxima atividade da enzima FAL aos 7 DAP (Figura 5A e B).

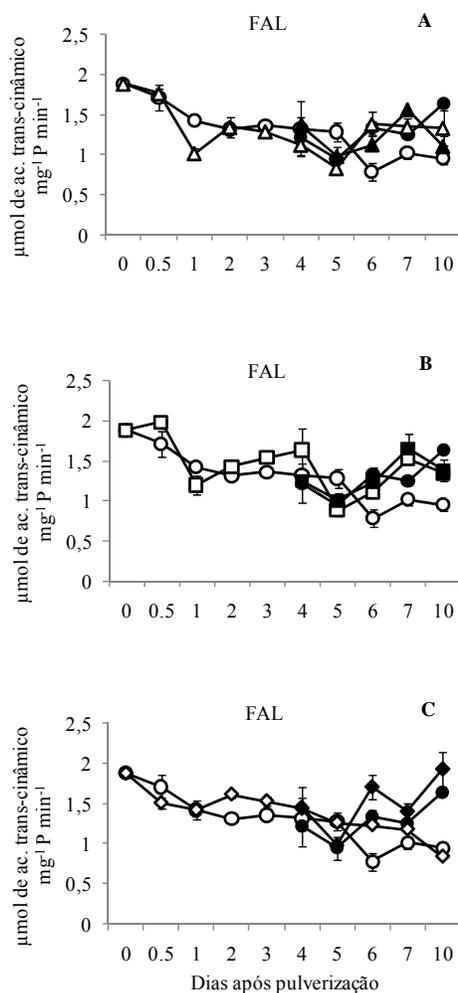


Figura 5 Atividade fenilalanina amônia liases (FAL) (μmol de ácido trans-cinâmico por mg de proteína por minuto) em folhas de tomate cv. Santa Cruz Kada, suscetíveis a *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) após pulverização com água (testemunha, $-\circ-$), água e inoculada com Xv (testemunha, $-\bullet-$), extrato de casca de maracujá 50% ($-\square-$), extrato de casca de maracujá 50% inoculado com Xv ($-\blacksquare-$), ASM ($-\diamond-$), ASM inoculado com Xv ($-\blacklozenge-$), extrato de casca de maracujá cultivado com *Cladosporium cladosporioides* a 50% ($-\Delta-$), extrato de casca de maracujá cultivado com *C. cladosporioides* a 50% inoculado com Xv ($-\blacktriangle-$). A inoculação com Xv ocorreu aos 4 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão da média

Plantas pulverizadas com M50, M50 + cc e ASM e não inoculadas não apresentaram aumento significativo nos teores de lignina aos 3 DAP, em relação às plantas pulverizadas com água (Figura 6A). Contudo, aos 14 DAP, foi observado que todos os tratamentos M50 + cc e M50, inoculados e não inoculados, e testemunha inoculada diferiram estatisticamente das plantas pulverizadas apenas com água e não inoculadas com *X. vesicatoria*, assim como as plantas pulverizadas com ASM, inoculadas e não inoculadas com *X. vesicatoria* (Figura 5B).

Em relação aos teores de fenóis solúveis totais, observa-se que não houve diferença significativa de nenhum tratamento em relação à testemunha aos 3 e 14 DAP. Todavia, observa-se que os teores de fenóis, em média, foi maior aos 3 DAP do que aos 14 DAP.

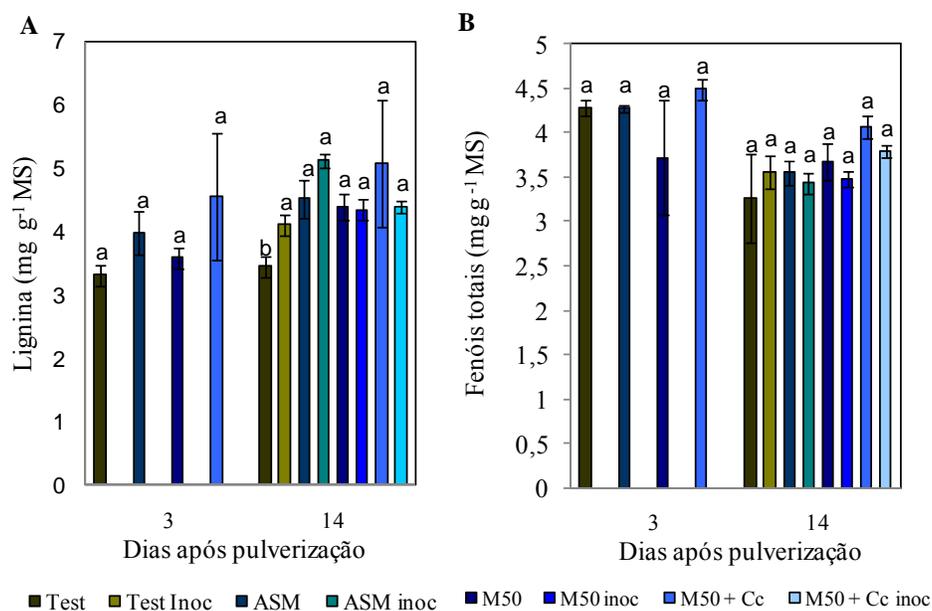


Figura 6 Teores de lignina (mg de lignina por g de matéria seca) e de fenóis solúveis totais (mg de fenóis totais por g de matéria seca) em folhas de tomate cv. Santa Cruz Kada, suscetíveis a *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) após pulverização com, água (test), água e inoculada com Xv (Test Inoc), extrato de casca de maracujá 50% (M50), extrato de casca de maracujá 50% inoculado com Xv (M50 + cc), Acibenzolar-S-Metil (ASM), ASM inoc (Acibenzolar-S-Metil inoculado com Xv), M50 + cc (extrato de casca de maracujá cultivado com *Cladosporium cladosporioides* a 50%), M50 + cc inoc (extrato de casca de maracujá cultivado com *C. cladosporioides* a 50% inoculado com Xv). A inoculação com Xv ocorreu aos 4 dias após a pulverização. Barras indicam o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra, em cada época de avaliação, não diferem pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$)

DISCUSSÃO

Neste estudo, extratos de maracujá na dose de 50%, cultivados ou não com *C. cladosporioides*, promoveram altos níveis de controle da mancha-bacteriana do tomateiro. Plantas pulverizadas com ASM, padrão de indução de resistência, apresentaram resultados semelhantes. Existem relatos na literatura da utilização de extratos no manejo desta doença, porém, os níveis de proteção encontrados no presente trabalho foram superiores. Cavalcanti et al. (2006b), obtiveram 31,4% de proteção ao pulverizar extratos de ramos de lobeira infectadas com *C. perniciosa* e Medeiros et al. (2009), ao utilizarem o extrato de folhas de café, observaram redução de 65% na severidade da mancha-bacteriana.

A redução do teor de clorofila das plantas esta relacionada à severidade da doença, devido à redução da atividade fotossintética pela destruição das moléculas de clorofila (LEITE; PASCHOLATI, 1995). No presente trabalho, plantas pulverizadas com M50 e M50 + cc apresentaram maiores teores de clorofila em relação à testemunha inoculada e também menor severidade da mancha-bacteriana. Resultados semelhantes foram obtidos por Cavalcanti et al. (2006b) que, ao pulverizarem plantas de tomate com extrato de ramos de lobeira e ASM, observaram que estas plantas apresentaram alta atividade fotossintética e indução de resistência contra *X. vesicatoria*.

Em relação ao ensaio *in vitro* para avaliar a toxicidade das formulações, foi observado que nenhum dos extratos testados apresenta efeito direto sob o crescimento desta bactéria. Resultados semelhantes foram obtidos por Cavalcanti et al. (2007), os quais comprovaram que suspensão aquosa de *C. perniciosa* ativa respostas de defesa do tomateiro contra *X. vesicatoria*, porém, sem apresentar efeito direto sob a bactéria.

No presente trabalho, extratos à base de casca de maracujá foram eficientes no controle da mancha-bacteriana porque eles são ricos em

oligogalacturonídeos (OGAs), fragmentos indutores de resistência. Portanto, as plantas de tomate reconheceram os OGAs ativando suas respostas de defesa, pois foi observado um aumento na atividade das enzimas, CAT, SOD, PPO e POX e maior deposição de lignina. Resultados semelhantes foram obtidos por Cavalcanti et al. (2006a), ao pulverizarem Ecolife[®], produto à base de biomassa cítrica, em plantas de tomate desafiadas com *X. vesicatoria*, observando aumento a atividade das enzimas POX, PPO e maior deposição de lignina nas folhas de tomateiro.

Os OGAs dispararam a cascata de sinalização no interior das células, pois plantas pulverizadas com M50 e ASM, logo após inoculação com *X. vesicatoria*, apresentaram aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e POX e as pulverizadas com M50 + cc apresentaram alta atividade da enzima POX. Estes resultados concordam com os de Bruce e West (1989) que induziram a atividade de POX ao tratar cultura de células de manona com OGAs.

Neste trabalho, o aumento na atividade da FAL, primeira enzima na rota dos fenilpropanóides, não foi expressivo, porém, maior que a testemunha pulverizada com água, em plantas pulverizadas com M50 e M50 +cc, assim como o padrão de indução de resistência, ASM. Concorda, assim, com o que foi relatado por Coqueiro, Maraschin e Piero (2011), que observaram máxima atividade da FAL aos 6 dias após pulverizarem plantas de tomate, posteriormente desafiadas com *X. gardneri*, com quitosana, eliciador de resposta de defesa derivado da parede celular fúngica. A ativação da FAL pode ter fornecido precursores para a síntese de lignina e fenóis, pois plantas pulverizadas com M50, M50 + cc, ASM, inoculadas e não inoculadas, responderam com aumento significativo no conteúdo de lignina aos 14 DAP, em relação à testemunha pulverizada com água.

A PPO, enzima associada ao processo de lignificação, apresentou alta atividade em plantas pulverizadas com os extratos M50 e M50 + cc no primeiro e no segundo dia após inoculação com *X. vesicatoria*. Cavalcanti et al. (2006a) relacionaram o aumento na atividade das enzimas POX e PPO com a redução na severidade da mancha-bacteriana, confirmando os resultados obtidos no presente trabalho.

Conclui-se que os extratos de maracujá testados apresentaram níveis de proteção satisfatórios semelhantes ao padrão de indução de resistência, ASM. Provavelmente, extratos de maracujá possuem OGAs, que foram capazes de ativar respostas de defesa das plantas por meio da ativação de enzimas de defesa e lignificação dos tecidos. Além disso, plantas pulverizadas com estes extratos não apresentaram alterações nos teores de clorofila *a*, *b* e total, em relação a plantas sadias, indicando que o manejo da doença se deu por indução de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v.24, n.1, p.1-15, 1949.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-54, May 1976.

BRUCE, R. J.; WEST, C. A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension-cultures of castor bean. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 91, n. 3, p. 889–897, Nov. 1989.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, July/Aug. 2006a.

CAVALCANTI, F. R. et al. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 98-208, Apr./June 2006b.

CAVALCANTI, F. R. et al. An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosa* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 5, p. 729-738, May 2007c.

COQUEIRO, D. S. O.; MARASCHIN, M.; PIERO, R. M. D. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 7/8, p. 488–494, Aug. 2011.

COSTA, L. M. A. S. **Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico G088**. 2007. 81 f. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

DE LORENZO, G. et al. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, n. 11, p. 1521–1528, June 2011.

DOIDGE, E. M. 1920. A tomato canker. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 7, n. 4, p. 407-430, Feb. 1921.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. P. 255-258.

FIELD, B.; JORDAN, F.; OSBOURN, A. First encounters - deployment of defence-related natural products by plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 172, n. 2, p. 193-207, Oct. 2006.

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 215, n. 1, p. 59-65, Nov. 1993.

GORE J.P.; O'GARRO L.W. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from bell pepper and tomato in Barbados undergoes changes in race structure, virulence anti sensitivity to chemical control agents. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.147, n. 7/8, p. 397-402, July 1999.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, n. 5, p. 713-721, July 1993.

LOUWS, F. J. et al. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, May 2001.

MEDEIROS F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 2, p. 355–360, Jan. 2001.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: A. BERGAMINI-FILHO, A.; H. KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. p. 417-453.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. 359 p.

RIDLEY B. L., O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-relate signaling. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 57, n. 6, p. 929–967, July 2001.

RODRIGUES, F. A. et al. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, n. 4, p. 144–159, Apr. 2005.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, Aug. 1977.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of aminoacid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 117-127, Sept. 1977.

STICHER, L.; MAUCHMANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, Sept. 1997.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 13, n. 1, p. 43–50, 1991.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, Sept. 2006.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of Xanthomonas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 45, n. 3, p. 472-489, July 1995.

WHITHAM, F. H.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. M. **Experiments in plant physiology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1971.