

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE
DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJÃO VAGEM**

SANDRA CRISTINA VIGO-SCHULTZ

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

BOTUCATU - SP

Julho-2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE
DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJÃO VAGEM**

SANDRA CRISTINA VIGO-SCHULTZ

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

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

BOTUCATU - SP

Julho-2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

V689a Vigo-Schultz, Sandra Cristina, 1977-
Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem / Sandra Cristina Vigo-Schultz. - Botucatu : [s.n.], 2008.
iv, 78 f. : gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Antonio Carlos Maringoni
Inclui bibliografia.

1. Feijão. 2. Xanthomonas. 3. Bactérias fitopatogênicas. 4. Fitopatologia - Controle alternativo. 5. Plantas medicinais. I. Maringoni, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DO
CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJÃO VAGEM"

ALUNA: SANDRA CRISTINA VIGO-SCHULTZ

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



PROF. DR. VALMIR LUIZ DE SOUZA



PROF. DR. JOÃO PEREIRA TORRES



PROF. DR. RAFAEL MOREIRA SOARES

Data da Realização: 11 de julho de 2008.

DEDICATÓRIA

Primeiramente ao Deus bondoso que me deu a oportunidade e forças nessa jornada, aos meus pais Dervi Antonio Vigo e Ione Regina Vigo pelo amor e carinho e apoio nos momentos difíceis, aos meus irmãos Marcelo Vigo, Luciano Vigo, Priscila Regina Vigo e Felipe Otávio Vigo pelo apoio e amizade, ao meu esposo Charles Schultz pela paciência, carinho e amor dedicados nesse trajeto de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrônômicas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, pela oportunidade oferecida, orientação e amizade.

À Prof. Dra. Giuseppina P.P. Lima, pela paciência, apoio, amizade e valiosas contribuições ao trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Unioeste, Marechal Cândido Rondon) pelo incentivo e disponibilidade em esclarecer dúvidas no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reginaldo da Silva Romeiro, pelo fornecimento de isolados para realização da pesquisa.

Aos demais Professores do setor de Defesa Fitossanitária, pelos ensinamentos e momentos agradáveis de convivência.

A todos os colegas do programa de pós-graduação em Produção Vegetal – Proteção de Plantas, em especial aos amigos Cristiane De Pieri, Lucas Mateus Rivero Rodrigues, Juan Fernan Sierra Hayer, Tadeu A. F. da Silva JR., Daniel Dias Rosa pelo bom convívio, ajuda e amizade.

Em especial à amiga e aluna de mestrado Renata de Cássia Camara pela constante ajuda, convívio, apoio e amizade em toda realização desse trabalho.

Aos amigos Clarice Backes, Elisa Eni Freitag, Alessandro J. Marques, Tammy Aparecida Khiil, Claudinei Paulo de Lima e Rúbia Renata Marques pelo convívio agradável e por tornar a vida mais fácil durante a realização desse trabalho.

Aos funcionários Norberto, Domingos, Paulo, Maria Aparecida (Dinha), Fátima, Maria do Carmo, Nivaldo e Ana Rita (Setor Defesa Fitossanitária), Cláudio e Vânia (Departamento Química e Bioquímica), pela amizade e atenção.

Às empresas Bioessencia Ltda, Basf, Sakata Seed Sudamerica Ltda e Centroflora pelo fornecimento de material para realização da pesquisa;

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. O feijão vagem e crestamento bacteriano comum.....	5
3.2 Controle alternativo e mecanismos de defesa das plantas	7
3.3 As plantas medicinais e seu potencial no controle de doenças	13
3.3.1 Plantas medicinais estudadas.....	15
3.3.2 Ação de plantas medicinais sobre fitopatógenos e no controle de doenças de plantas	19
CAPÍTULO I.....	24
Ação de tinturas etanólicas e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência ao crestamento bacteriano comum do feijoeiro	25
CAPÍTULO II.....	49
Atividade antimicrobiana de piraclostroquina <i>in vitro</i>	52
Indução de resistência em feijão vagem ao crestamento bacteriano comum	53
4. CONCLUSÕES	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. RESUMO

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF), incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, é responsável por expressivos danos na cultura e por reduções no rendimento e qualidade dos grãos. A preocupação com o meio ambiente e o uso indiscriminado de agrotóxicos tem impulsionado a pesquisa para a busca de métodos alternativos ao controle de patógenos em plantas. Os indutores de resistência têm se mostrado eficientes e promissores no controle de diversos patógenos de culturas. O presente trabalho teve como objetivos verificar o potencial de tinturas etanólicas de *Lippia alba* (erva cidreira), *Lippia sidoides* (alecrim pimenta), *Mikania glomerata* (guaco), *Equisetum* sp. (cavalinha) e *Hedera helix* (hera), óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e de piraclostrobina e acibenzolar-S-metil no controle do crestamento bacteriano comum em feijão vagem cultivar Bragança. Esses produtos foram utilizados nos seguintes ensaios: atividade antimicrobiana *in vitro* (exceção ao acibenzolar-S-metil), atividade *in vivo* em plantas cultivadas sob condições de casa de vegetação, tratadas com os produtos e calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD); atividade de polifenoloxidasas, peroxidases e proteínas solúveis totais em folhas tratadas e não tratadas de feijão vagem, inoculadas e não inoculadas, coletadas em diferentes épocas (0, 3, 5, 8 e 10 dias após pulverização das tinturas etanólicas, óleos essenciais, acibenzolar-S-metil e pyraclostrobin). Os resultados obtidos demonstraram que as tinturas de *L. alba* e *L. sidoides* e os óleos

essenciais apresentaram atividade *in vitro* aos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, enquanto que piraclostrobina não apresentou ação *in vitro* sobre a bactéria. A tintura etanólica de *L. alba*, pyraclostrobin e acibenzolar-S-metil apresentaram menores valores da AACPD, em relação ao tratamento testemunha. Maiores valores nos teores de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais foram observados nos folíolos das plantas pulverizadas com esses produtos que provavelmente estejam relacionados com a indução de resistência. Os óleos essenciais não apresentaram diferença na AACPD e nem a indução de proteínas.

Palavras chave: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Phaseolus vulgaris*, controle alternativo, plantas medicinais

EVALUATION OF THE RESISTANCE INDUCTION ON THE CONTROL COMMON BACTERIAL BLIGHT IN SNAP BEAN. Botucatu, 2008. 88 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Author: Sandra Cristina Vigo-Schultz

Adviser: Dr. Antonio Carlos Maringoni

2. ABSTRACT

Common bacterial blight of snap bean (CBCSB), caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* responsible for expressive culture damage and reduction of seeds production and quality. The environmental impact of the indiscriminate use of pesticides has lead to search alternative methods of plant pathogens control. Resistance inducers have been efficiently successful on several plant pathogens control. Thus, this study aimed to evaluate the potential of alcohol extracts of *Lippia alba* (Melissa), *Lippia sidoides* (pepper-rosmarin), *Mikania glomerata* (guaco), *Equisetum* sp. (horsetail) and *Hedera helix* (English Ivy), essential oils of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) and, pyraclostrobin and acibenzolar-S-metil on the control of common bacterial blight in snap beans, Bragança cultivar. These products were used in the following assays: *in vitro* bactericidal activity (except for acibenzolar-S-metil), *in vivo* activity of greenhouse-cultivated plants treated with products and the area under the disease progress curve (AUPDC) was calculated; activity of polyphenoloxidases, peroxidases and total soluble proteins in treated and

untreated bean leaves, infected and non-infected leave collected in different stages (0, 3, 5, 8 and 10 days after sprinkling with alcohol extracts, essential oils, acibenzolar-S-metil and pyraclostrobin). Results showed *in vitro* activity against *X. axonopodis* pv. *phaseoli* for *L. alba* and *L. sidoides* extracts, and essential oils while pyraclostrobin did not show any *in vitro* activity effect. *L. Alba* alcohol extract, pyraclostrobin and acibenzolar-S-methy showed the lowest AUPDC values compared to control treatment. The highest poliphenoloxidasas, peroxidases and total soluble proteins values were observed in plant leaflets sprinkled with these products which probably are related to resistance induction. Essential oils did not show difference on AUPDC nor protein induction.

Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Phaseolus vulgaris*, alternative control, medicinal plants

3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O feijão vagem e o crestamento bacteriano comum

O feijoeiro é uma planta herbácea, dicotiledônea originária das Américas, pertencente à família Leguminosae, pode apresentar hábito de crescimento determinado ou indeterminado, com ciclo anual variando de 60 a 120 dias (SANTOS & GAVILANES, 2006). O feijão vagem pertence à mesma espécie botânica do feijão para grãos secos: *Phaseolus vulgaris* L. Caracteriza-se por ser colhido quando as sementes estão ainda imaturas (FILGUEIRA, 2000). Há cultivares de porte alto, de crescimento indeterminado e exigentes em tutoramento. Outras são de crescimento determinado, de porte anão e apresentam ciclo mais curto (CASTELLANE et al., 1988). A produção de feijão-vagem para o consumo humano é caracterizada em grande parte por cultivares com hábito de crescimento indeterminado (QUEIROGA et al., 2003). É uma cultura plantada em cerca de 100 países em todo o mundo, envolvendo grande número de gêneros e espécies (ARAÚJO et al., 1996).

O feijão-vagem é a décima terceira hortaliça em termos de importância econômica e a sexta em volume produzido no país. É uma hortaliça que se adapta bem em climas amenos ou quentes com temperaturas variando entre 18 °C e 30 °C, sendo prejudicada por temperaturas acima de 35 °C ou sob frio intenso (NADAL et al., 1986). Esta

olerícola possui o maior volume de comercialização na CEASA-PR, atingindo cerca de 6000 toneladas por ano. A comercialização é feita durante todos os meses do ano, sendo julho, agosto, setembro e outubro os meses de menor oferta do produto. A produção destina-se ao consumo *in natura*, sendo pequeno o volume industrializado (PEREIRA et al., 2003). Apesar de não ser rica em proteínas e calorias como os grãos secos, é rica em vitaminas e sais minerais, que faltam na maioria dos alimentos (PEIXOTO et al., 1997).

O feijoeiro é uma planta bastante vulnerável à ação dos agentes de natureza abiótica (clima) ou biótica (organismos vivos), caracterizado por acentuada instabilidade produtiva (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000). Em função da expansão das áreas cultivadas no Brasil e do cultivo sucessivo, principalmente em áreas irrigadas, há uma maior contribuição para o aumento e disseminação dos patógenos. Além de ser suscetível a inúmeras doenças que diminuem a produtividade da cultura e podem depreciar a qualidade do produto (SARTORATO, 2008).

As doenças estão entre os principais fatores causadores da redução à produção em uma lavoura, sejam elas causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematóides. Dentre estes patógenos que ocorrem sobre as espécies de plantas de expressão econômica na agricultura brasileira, as bactérias têm assumido uma importância crescente, quer pela gravidade das enfermidades que incitam nas culturas, pela facilidade com que se disseminam ou pelas dificuldades encontradas no controle das enfermidades por elas causadas (ROMEIRO, 2005; SILVA, 2007).

Vários tipos de patógenos afetam esta cultura causando doenças e acarretando perdas significativas na produção. Entre estes o horticultor têm se preocupado com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento bacteriano comum, que possui grande importância para a cultura, devido sua distribuição quase generalizada, transmissão pela semente, ineficiente controle químico, insatisfatórios níveis de resistência em cultivares avaliadas (ZAPATA, 1996) e os danos severos na produtividade, principalmente sob cultivo protegido (BARROS et al., 2000).

Os primeiros sintomas surgem na forma de manchas aquosas, com crescimento irregular, na face inferior dos folíolos, tornando-se de coloração parda e aspecto necrótico, circundadas por halo de tecido amarelo, coalescendo e originando o crestamento. Quando as lesões adquirem grandes proporções pode ocorrer o desfolhamento das plantas.

Nos caules jovens as lesões começam como manchas aquosas, crescendo gradualmente e adquirindo coloração avermelhada, podendo aparecer nestas lesões exsudação bacteriana amarelada. A infecção pode atingir as vagens ocorrendo ao longo da sutura dorsal, atingindo as sementes via funículo (BIANCHINI et al., 2005).

A disseminação ocorre através de sementes infectadas e restos de cultura. O clima úmido, com temperaturas altas (28 °C), favorece o desenvolvimento da doença, ocasionando grandes perdas na cultura, entretanto, a atividade da bactéria declina conforme diminui a temperatura, paralisado aos 16 °C (BIANCHINI et al., 2005).

Para a redução na severidade desta doença e obtenção da produtividade esperada, recomenda-se manejo integrado da cultura, utilizando várias medidas de controle que incluem o uso de cultivares resistentes ou tolerantes, rotação de culturas e sementes certificadas (LOLLATO, 2002); aração profunda para incorporação de restos culturais infectados, bom preparo e fertilidade do solo, época de semeadura e manejo da irrigação (MARINGONI, 2002).

A eficácia do controle químico do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, através de pulverização das plantas com produtos bactericidas, têm sido de pouca magnitude nas lavouras, devido à baixa eficiência destes. Pesquisas desenvolvidas no Paraná evidenciaram a ineficácia de três pulverizações dos produtos oxicloreto de cobre, sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina, oxicloreto de cobre + maneb e oxicloreto de cobre + zineb no controle da doença nas folhas e vagens e na redução da transmissão da bactéria por sementes (BIANCHINI et al., 2005). Por esse motivo, a utilização de métodos alternativos de controle, entre os quais se inclui a indução de resistência em plantas, está sendo pesquisado e utilizado.

3.2 Controle alternativo e mecanismos de defesa das plantas

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas e o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

O controle biológico pode ser definido como o controle de um microrganismo através da ação direta de um outro microrganismo antagônico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (BONALDO et al., 2004).

A resistência do hospedeiro a uma doença pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno nos tecidos da mesma (AGRIOS, 2005).

As plantas são continuamente expostas a um grande número de patógenos, como resultado, apresentam um complexo mecanismo de defesa para reconhecer e se proteger, através do desenvolvimento de barreiras, como mecanismos de defesa pré e pós formados que restringem a infecção/colonização. Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (SBALCHEIRO, 2006; MAZARO, 2007).

Os fatores de resistência pré-formados são aqueles presentes na planta antes do contato com o patógeno e são denominados de defesas constitutivas sendo representados por estruturas tais como: ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, fibras vasculares e adaptações em estômatos, bem como substâncias químicas pré-formadas, como fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fotoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (PASCHOLATI & LEITE, 1995; AGRIOS, 2005). Já os pós-formados, estão ausentes ou em baixo nível antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Estes mecanismos envolvem a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tilose deposição de goma, além de compostos bioquímicos como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese espécies reativas de oxigênio (PASCHOLATI & LEITE, 1995; AGRIOS, 2005). A seqüência de eventos relacionados à indução e expressão da resistência ou resposta de defesa inicia-se com o reconhecimento pelo hospedeiro de alguma característica química ou estrutural do patógeno, ou agente de estresse ou dano associado com a invasão. Esta percepção resulta na produção ou liberação de um composto sinalizador que é responsável pela indução da resposta de defesa da planta (JOHAL et al., 1995).

Os genes de resistência estão associados com o incremento do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (JALALI et al., 2006). A resistência sistêmica adquirida (RSA) está associada ao AS, o qual é o sinalizador para a expressão de certas proteínas relacionadas à patogenicidade (GRÜNER et al., 2003; GLAZEBROOK, 2005). As diferentes formas de resistência foram descobertas recentemente, pois algumas plantas não respondiam bioquimicamente a indutores como a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*. Essas rizobactérias induzem a resistência sistêmica induzida (RSI) que é independente do ácido salicílico e não está associada com a ativação dos mesmos genes da RSA. Em substituição ao AS, a RSI requer, para a sua ativação, o aumento dos níveis de AJ e etileno (BOSTOCK, 2005). No entanto, independente do agente biótico indutor, a comunicação cruzada entre as diferentes rotas já foi demonstrada (HEIL & BOSTOCK, 2002). Sendo assim, alguns autores preferem a utilização do termo geral indução de resistência, para se evitar confusões (HAMMERSCHMIDT et al., 2001).

Kuc (2000) observa que um composto iniciador da indução de resistência não pode ser sintetizado ou transportado por uma planta antes que um sinal tenha sido recebido para desencadear o processo. Trabalhos realizados demonstraram que ocorre acúmulo de AS no local e sistemicamente após a infecção por patógenos em diversas espécies de plantas, provando a exigência desse composto para o acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese e outros agentes do metabolismo secundário (DURRANT & DONG, 2004).

Um dos mais eficientes mecanismos de defesa é a reação de hipersensibilidade, onde há a indução da produção de fitoalexinas e de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta, resultando na morte repentina de um número limitado de células do hospedeiro em torno dos sítios de infecção (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

As proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-RPs) foram descritas pela primeira vez em 1970, por Van Loon, que observou o acúmulo de proteínas incomuns após infecção de plantas de fumo com o vírus TMV (DURRANT & DONG, 2004). Elas foram inicialmente definidas como proteínas ácidas, de baixo peso molecular, resistentes a proteases, solúveis em ácidos e localizadas nos espaços extra-celulares, sendo mais tarde identificadas também nos vacúolos. As proteínas-RPs presentes nos vacúolos geralmente exercem um efeito de defesa após a descompartimentalização das células, enquanto que as

proteínas-RPs extracelulares atuam diretamente em contato com o patógeno no processo de penetração do tecido (STICHER et al., 1997). Atualmente são classificadas em 17 famílias distintas, baseando-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, relação sorológica ou atividade enzimática ou biológica (GUZZO, 2004).

Polifenoloxidasas (PFO), também conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases são enzimas intracelulares que ocorrem em plantas, animais e fungos (ZAWISTOWSKI et al., 1991; WHITAKER, 1994). Estas enzimas contém cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando orto-difenóis e a segunda à oxidação de ortodifenóis formando orto-quinonas. As PFO atuam sobre uma grande variedade de substratos. Citase p-cresol, tirosina e ácido p-cumárico como substratos monofenólicos, enquanto catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico substratos difenólicos (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). A expressão de genes que codificam PFO é altamente correlacionada com a ativação da via sinalizadora dos octadecanóides, indicando que esta rota regula a expressão destas enzimas (CONSTABEL et al., 1995).

Estas enzimas permanecem de maneira intracelular, compartimentalizadas dentro dos tilacóides nos cloroplastos e em sua grande maioria em estado inativo (VAUGHN et al., 1988), onde são liberadas e iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos, que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas, na medida em que ocorre a ruptura da célula, ocasionada por ferimentos, ação de insetos ou patógenos, ou ainda senescência (MACHEIX et al., 1986; CONSTABEL et al., 1995; MOHAMMADI & KAZEMI, 2002; BINDSCHEDLER et al., 2002; THIPYAPONG et al., 2004). As PFO também participam do processo de lignificação durante a invasão por patógenos (JUNG et al., 2004).

Na indução de resistência, Chérif et al. (1994) concluíram que a conversão de fenóis a compostos tóxicos, proporcionados pela PFO, foi em grande parte responsável pelo aumento da resistência em plantas de pepino induzidas por silicatos solúveis contra *Pythium aphanidermatum*, agente causal de tombamento.

A peroxidase (POD) é uma importante enzima das plantas e está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de

patógenos, regulação da elongação de células e outras (GASPAR et al., 1982; KAO, 2003). A ativação das formas latentes de peroxidase, após a destruição ou inativação de inibidores protéicos ou fenólicos, pode conduzir à indução de síntese de isoformas de peroxidase (BIRECKA et al., 1973).

O funcionamento básico das PODs consiste em reagir com compostos contendo grupos hidroxila anexado a um anel aromático. A reação é a oxidação desidrogenativa do guaiacol que resulta na formação de radicais fenoxi, sendo que a subsequente ligação de radicais instáveis leva a polimerização não enzimática de monômeros e de maneira similar, hidroxicinamil álcool e seus derivados são convertidos em radicais fenoxi formando lignina, bem como o ácido hidroxicinâmico é convertido em suberina (HIRAGA et al., 2001). O papel destas enzimas no processo de defesa é reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos ferulicolados e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (BOWLES, 1990), aumento na produção de espécies ativas de oxigênio que apresentam ação antimicrobiana, bem como atuam na sinalização (KAWANO & MUTO, 2000; RESENDE et al., 2003), incitando a formação de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999), participam também na peroxidação de lipídios que apresentam papel na sinalização, induzindo o acúmulo de AS (LÉON et al., 1995).

Na indução de resistência as PODs têm se mostrado muito eficientes e são bastante estudadas. Madi & Katan (1998) observaram o aumento de forma sistêmica de POD em melão e em algodão em função do tratamento, por infiltração, de filtrado de cultura ou suspensão de esporos de *Penicillium janczewskii*, um fungo promotor de crescimento, que reduziu a incidência de tombamento de *Rhizoctonia solani* em 85%, em ambas culturas.

A indução de resistência em plantas pode ser definida como uma resistência dinâmica baseada na produção de barreiras físicas e/ou químicas estimuladas pela aplicação de uma substância indutora. É um fenômeno sistêmico ou local, efetivo contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias fungos ou vírus (BONALDO et al. 2005; SILVA, 2007). Os agentes indutores ou ativadores de resistência podem ser microrganismos saprofíticos, patógenos de plantas, metabólitos microbianos, extratos de plantas, agentes químicos, entre outros (LIU et al. 1995; CAVALCANTI et al., 2005; SBALCHEIRO, 2006).

Os indutores aumentam o nível de resistência da planta, sem alterar seu genoma. Eles ocorrem por meio da ativação de genes, de maneira não específica, que

codificam diversas respostas de defesa, incluindo compostos fenólicos e enzimas como peroxidase e polifenoloxidase. Algumas formas de fenóis podem ser convertidas em derivados com radicais de oxigênio, extremamente reativos, tornando-se muito tóxicos (HARTLEB et al., 1997).

A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo que ocorre entre o tratamento com o indutor e a subsequente inoculação da planta (agente desafiante). Portanto, essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, que envolvem a síntese e/ou acúmulo de substâncias, são importantes no fenômeno da resistência induzida (BONALDO et al. 2005). Por exemplo, o tratamento de folhas de ervilha com ácido salicílico só foi eficaz quando estas foram inoculadas três ou mais dias após a aplicação do produto (FREY & CARVER, 1998).

Vários agentes podem induzir a produção de sinais no vegetal, disparando reações que culminarão em proteção duradoura contra uma ampla gama de fitopatógenos (Sobrinho et al., 2005). O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM, BTH, CGA 245704, Bion®, Actigard®), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (TERRY & JOYCE, 2004). Em cafeeiro susceptível a *Hemileia vastatrix*, o uso de ASM, induziu a RSA e conferiu proteção à planta (GUZZO et al., 2001). Os mesmos autores observaram, ainda, pela microscopia de fluorescência, que o ASM, aplicado *in vitro*, não interfere na germinação dos esporos e na formação de apressórios de *H. vastatrix*, concluindo que o ASM não possui ação antimicrobiana direta aos patógenos, mas induz a expressão de genes de resistência para a formação de compostos que impedem ou dificultam o estabelecimento ou desenvolvimento destes patógenos.

O composto ASM conferiu proteção em fumo contra o vírus TMV e os fungos *Cercospora nicotianae*, *Phytophthora tabacina*, *Phytophthora parasitica* e as bactérias *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (FRIEDRICH et al., 1996), em trigo contra *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* (GÖRLACH et al., 1996), em *Arabidopsis thaliana* contra o fungo *P. parasitica*, a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* e ao vírus TCV (LAWTON et al., 1996), em tomate contra a bactéria *Clavibacter michiganensis* sbsp.

michiganensis (BAYSAL et al., 2003), em feijoeiro contra *Uromyces appendiculatus* (ROMEIRO et al., 1999; IRITI & FAORO, 2003).

Liu et al. (2005), em tratamento pós-colheita de frutos de pêssego com acibenzolar-S-metil (ASM), observaram aumento na atividade de PFO, promovendo redução da severidade de *Penicillium expansum* em 50%. Para Pereira et al. (2008), a indução de resistência com ASM e filtrado de micélio de *Rhizopus* sp. (FMR), também resultou em aumento na atividade de PFO após 72 h da pulverização, em tratamento de mudas de cacaueteiro contra murcha-de-verticílio, promovendo redução da severidade de *Verticillium dahliae* em 38 e 23% para ASM e FMR, respectivamente. A atividade de POD aumentou gradualmente, em tratamento com ASM em plantas de feijão cupi e desafiadas com *Macrophomina phaseolina*, observando-se a maior atividade a partir das 72 e 84 horas, para os tratamentos ASM e inoculação e ASM, respectivamente (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2006).

O grupo de fungicidas das estrubirulinas compreende uma variedades de produtos sintéticos para proteção de plantas com amplo espectro antifúngico e semelhança estrutural a antibióticos de basidiomicetos (HERMS et al., 2002). Ao longo dos anos tem-se observado também evidências de influências diretas das estrubirulinas na fisiologia de plantas. Este efeito fisiológico inclui o chamado “greening” que, até mesmo na ausência do ataque de patógenos, as plantas tratadas com estrubirulinas ficam com um verde intenso e parecem mais saudáveis do que plantas não tratadas com o produto (KOEHLER et al., 2002). Isto sugere que além da atividade fungicida destes produtos, eles também podem aumentar a capacidade das plantas se defenderem contra os patógenos (HERMS et al., 2002).

3.3 As plantas medicinais e seu potencial no controle de doenças

O Brasil possui uma vasta flora medicinal. Contudo, pouco ou quase nada é feito no sentido de explorar estes recursos como fonte de divisas para o país ou mesmo para seu aproveitamento pelo mercado interno. Muitas substâncias exclusivas de plantas

brasileiras encontram-se patenteadas por empresas ou órgãos governamentais estrangeiros, porque a pesquisa nacional não recebe o devido apoio (MARTINS et al., 2000).

Uma planta é tida como medicinal quando em sua composição ocorrem substâncias químicas biologicamente sintetizadas a partir de nutrientes, água e luz. O grau de concentração do princípio ativo na planta, bem como sua forma de preparo e forma de administração é o determinante da ação terapêutica ou tóxica das espécies medicinais (MUÑOZ, 2002).

Um dos principais e grandes entraves na área de plantas medicinais é a confusão popular da pluri nomenclatura regional de muitas ervas. Posteriormente, faz-se necessário o estudo do modo de propagação das espécies, visando observar a maior eficiência econômica, além de manejos culturais, procedimento de colheita, processamento da produção e comercialização, entre outros (SILVA JÚNIOR et al., 1996).

Até o momento, ainda não se conhece quase nada sobre a composição química de quase 99% das plantas de nossa flora, estimadas entre 40 mil a 55 mil espécies (MING, 1996). Além disso, grande quantidade de compostos secundários das plantas medicinais já isolados e com estrutura química determinada ainda não foram estudados quanto as suas atividades biológicas. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, flavanóides, cumarinas, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, óleos essenciais, entre outras. Os metabólitos secundários apresentam características diferenciadas dos produtos do metabolismo primário devido, não serem vitais para as plantas na maioria das vezes, como os alcalóides; serem a expressão da individualidade química das espécies; e serem produzidos em pequena quantidade (MARTINS et al., 2000).

Quando esses compostos são extraídos das plantas por processos específicos, como a destilação por arraste de vapor de água, originam líquidos de consistência semelhante ao óleo, voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, denominados de óleos essenciais (SILVA & SANT'ANA, 1995). Quando esses compostos são extraídos pela ação do álcool sobre uma erva seca ou uma mistura de ervas secas originam as tinturas simples ou compostas, respectivamente (TESKE & TRENTINI, 1997).

3.3.1 Plantas medicinais estudadas

Sob o nome de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) são conhecidas várias plantas trepadeiras do gênero *Mikania*, cujas folhas apresentam o formato de coração (GEOPLANT, 2002). Estas plantas são nativas da América do Sul, sendo abundantes no Brasil, especialmente nas regiões Sul e Sudeste, mas crescem também na Argentina, Paraguai e Uruguai (TESKE & TRENTINI, 1997). É uma planta herbácea trepadeira pertencente à família Asteraceae. Possui ramos lenhosos, cilíndricos e castanhos, com folhas lanceoladas verdes e inervadas longitudinalmente. Tem preferência pela iluminação meia sombra ou plena e o plantio é efetuado por estacas. As folhas podem ser utilizadas com finalidade medicinal em dermatites e micose, dentre outras (CORRÊA et al., 1999).

O guaco possui em sua composição química flavanóides, cumarinas, terpenos (ácido caurenóico, ácido grandiflórico, cinamiol, estigmasterol), guacina, glicosídeos, resinas e taninos (CORRÊA et al., 1999).

A ação antitussígena do chá preparado com as folhas secas de *M. glomerata* foi confirmada nos estudos científicos. Esta atividade se deve à presença de uma substância química chamada cumarina, substância esta que pode também apresentar atividade antimicrobiana (GEOPLANT, 2002).

Trabalhos realizados na área humana têm demonstrado que extrato bruto de guaco provoca inibição do crescimento e a morte dos microrganismos responsáveis pela formação da placa bacteriana e pela candidíase (DUARTE, 2002; ROSALEN, 2002; ROSALEN et al., 2004).

A cavalinha (*Equisetum* sp. Lineu) é uma planta criptógama, perene da família Equisataceae, caule aéreo, verde com até 1 m de altura, apresenta estrias e é impregnada de sílica. As folhas são pequenas, escamiformes, soldadas entre si na base. Os estróbilos terminais são encontrados nos ápices dos ramos férteis (HERTWIG, 1986; SILVA & SANT'ANA, 1995).

Equisetum sp. é vulgarmente conhecida como cavalinha, rabo de cavalo, sola de cavalo, lixa vegetal, erva canudo, milho de cobra, cauda eqüina, cavalinha dos campos, rabo de raposa e rabo de rato. Esta planta ocorre comumente em lugares úmidos e

terrenos pantanosos e propaga-se por touceiras (CORRÊA JR. et al., 1994; MARTINS et al., 1994; CORRÊA et al., 1998).

A cavalinha é usada na medicina pelo seu valor terapêutico e tem indicação de uso como diurética, hemostática e em casos de incontinência urinária, sudorese dos pés, diarreia e gonorréia. Pode também ser usada como planta ornamental (CORRÊA JR. et al., 1994; SILVA et al., 1995; MARTINS et al., 2000).

Equisetum sp. possui os seguintes princípios ativos: ácido silícico, flavanóides, sais de potássio, ferro e magnésio e taninos (ácido gálico) (SILVA & SANT'ANA, 1995; CORRÊA et al., 1998).

Descrita como um arbusto perene da família Verbenaceae de origem na América do Sul, a erva cidreira (*Lippia alba* Mill.) possui folhas oblongo-agudas e opostas; flores róseas, reunidas em capítulo axial. Os ramos novos são pubescentes e os velhos, glabros. Atinge até três metros de altura. Cheiro semelhante ao da *Melissa officinalis* e do capim-santo (MARTINS et al., 2000).

A espécie é conhecida popularmente pelos nomes de erva-cidreira-do-campo, alecrim-do-campo, alecrim-selvagem, cidreira-brava e falsa-melissa. Não tolera excessos de calor ou frio e cresce espontaneamente no Sul e Sudeste brasileiro. A propagação é feita por estacas facilmente enraizadas em viveiro. A colheita é feita normalmente 5 a 6 meses após o plantio, sendo coletados os ramos floridos ou não, durante todo o ano (MARTINS et al., 2000).

Para uso medicinal é utilizada como antiespasmódico, estomáquico, carminativo, calmante, digestivo. Combatendo também a insônia e a asma. Possui em sua composição química óleo essencial, contendo geranial, neral, cariofileno, citronelol, geraniol, dentre outros; as folhas contém ainda alcalóides e flavanóides (MARTINS et al., 2000).

Hera (*Hedera helix* Lineu) é uma trepadeira da família Araliaceae, semi-lenhosa e vigorosa. Originária da Europa, Ilhas Canárias, norte da África e Ásia, de ramagem densa e longa, com numerosas raízes adventícias e folhagem decorativa. Planta muito variável, com diversas variedades geográficas e inúmeras formas hortícolas e variegadas. Inflorescências eventuais formadas durante o verão e sem valor ornamental (LORENZI & SOUZA, 2001).

Cultivada em vasos como planta pendente ou apoiada em suporte de xaxim e para revestimento de muros e paredes bem como para forração em canteiros a pleno sol ou meia-sombra. Tolerante a geadas. Multiplica-se facilmente pro estacas, preparadas em qualquer época do ano (LORENZI & SOUZA, 2001).

Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) (syn. *L. multicapitata* Mart.) é uma planta arbustiva, aromática, que ocorre na região nordeste do Brasil com grande frequência na área abrangida pelos municípios de Mossoró, RN e Tabuleiro do Norte (CE), onde é conhecida pelos moradores das zonas rurais como alecrim-pimenta, alecrim e estrepa-cavalo. Suas folhas são utilizadas popularmente sob a forma de chá abafado ou tintura como anti-séptico local (COSTA et al., 2001; SOUSA et al., 2002; LEAL et al., 2003).

Seu óleo essencial, rico em timol e carvacrol, apresentou propriedades bactericida e fungicida, enquanto o hidrolato revelou atividade moluscicida e larvicida. Em virtude destas propriedades, este vegetal é cultivado em hortos de plantas medicinais (COSTA et al., 2002). O principal constituinte do óleo é o timol, cujo teor tem variado entre 34,2 a 95,1% em várias determinações. Outros constituintes encontrados são p-cimeno, α -terpineno e β -cariofileno. O estudo químico de extratos de *Lippia sidoides* levou ao isolamento e caracterização de compostos fixos, incluindo dois dímeros naftoquinônicos (lapachenolisocatalponol e tectol), ésteres metílicos naturais dos ácidos graxos de C₁₆ a C₂₄, β -sitosterol, ácido vanílico, 2-metil-5-isopropilfenol e a 5-4-dihidroxi-6,7-dimetoxi-flavona. O espectro de atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial se relaciona a microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp*, *Streptococcus mutans*, *Corynebacterium xerosis*, *Cândida albicans*, *Trichophytum rubrum* e *Trichophytum interdigitale*, dentre outros (LEAL et al., 2003).

Planta semi arbustiva, perene, lenhosa, ramificada, da família Lamiaceae, cuja altura oscila entre 50 cm a 2 m, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* Lineu), possui folhas de comprimento de 2 a 4 cm e largura de 1 a 4 mm, sendo lineares, estreitas, opostas, sésseis, coriáceas, com bordos recurvados ou enrolados para dentro ao longo da nervura central. A página superior das folhas é verde rugosa, e a página inferior com pêlos finos é brilhante e esbranquiçada. As flores estão dispostas em pequenos cachos na axila de brácteas e possuem cor azul-violeta, rosada ou branca (HERTWIG, 1986; SILVA & SANT'ANA, 1995; CORRÊA et al., 1998).

R. officinalis é originária do Mediterrâneo, sendo vulgarmente conhecida como alecrim, alecrim-de-jardim, rosmarim, rosmarinho, rosmarino, libanotis, alecrim de cheiro e alecrim de horta. Esta planta é cultivada em escala comercial na Espanha, sul da França, Tunísia, Marrocos, Iugoslávia e sul da Itália, vegetando espontaneamente em terrenos rochosos e arenosos (HERTWIG, 1986). Parece não haver dúvidas de que a boa qualidade de *R. officinalis* está diretamente relacionada com a localização (latitude), condições locais de solo, clima, altitude, boa exposição à luz solar e a época de colheita (verão ou inverno). *R. officinalis* pode ser propagado na primavera ou verão brando por sementes ou então por alporquia e estaquia antes ou depois da floração mais intensa. A produtividade média, quando plantada em condições ideais de clima e solo, pode chegar ao redor de 11.500 kg/ha de planta fresca e 3.900 kg/ha de matéria seca (CORRÊA JR. et al., 1994; SIMÕES et al., 1995; MARTINS et al., 2000).

O alecrim é usado na medicina pelo seu valor terapêutico e tem indicação de uso como estimulante digestivo e para falta de apetite (inapetência), contra azia, para problemas respiratórios e debilidade cardíaca (cardiotônico), contra cansaço físico e mental, combate hemorróidas, antiespasmódico, abranda os quadros febris, afecções hepáticas e das vias biliares, dispepsia, flatulência, ansiedade, astenia, anorexia, cefaléia e dores de origem reumática (uso interno), tem efeito diurético e antimicrobiano, é aplicado em contusões, dores de origem reumática, calvice e cicatrizante (uso externo) (HERTWIG, 1986; SILVA & SANT'ANA, 1995; CORRÊA et al., 1998).

R. officinalis têm os seguintes princípios ativos: taninos, flavanóides, óleo essencial rico em terpenos (cineol, pineno, borneol, canfeno, eucaliptol, acetato de isobornila, valerianato de isonila, cânfora), além de saponinas, ácidos (cítrico, glicólico, glicínico, rosmarínico), nicotinamida, colina, pectina, rosmaricina e vitamina C (HERTWIG, 1986; CORRÊA et al., 1998; MARTINS et al., 2000).

Cinnamomum zeylanicum Blume, planta pertencente à família Lauraceae, é popularmente conhecida no Brasil como canela e mundialmente, no comércio, como cinnamon (RAINA et al., 2001). A canela é nativa e largamente cultivada no Sri Lanka, podendo ser encontrada em toda a Ásia tropical, como algumas partes da Índia. Estas espécies de árvores ocorrem no sul da Índia em altitudes superiores a 500 metros, porém é comum

encontrá-la em menores altitudes também (JAYAPRAKASHA et al., 1997; RAINA et al., 2001).

As cascas de canela são usadas como aromatizantes e fitoterápicas (JAYAPRAKASHA et al., 2006). A folha e a casca da planta são utilizadas em todo o mundo como especiarias. O óleo extraído das folhas pode ser de dois tipos, um contém eugenol e o outro contém benzil benzoato como principal constituinte. Para o óleo extraído das cascas do caule também se pode ter dois tipos, um contendo cinnamaldeído e o outro contendo benzil benzoato como maior constituinte (RAINA et al., 2001).

Na medicina natural a casca de canela é descrita como sendo um estimulante, antiflatulência, antidiabética e com propriedades antidiarréicas. Ela também tem sido estudada para atividades antibacterianas e antidermáticas (KAMATH et al., 2003).

3.3.2 Ação de plantas medicinais sobre fitopatógenos e no controle de doenças de plantas

Na literatura é possível encontrar um grande número de trabalhos que utilizam as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários de plantas medicinais para o controle de agentes fitopatogênicos. French et al. (1978) verificaram que aldeídos como nonanal e compostos relacionados, além dos componentes presentes no óleo de *Citrus* sp. inibiram a germinação de conídios de duas espécies de *Penicillium* em ágar-água 1%.

Óleo essencial de *Ocimum adscendens* foi capaz de proteger sementes de *Capsicum annum* contra 16 fungos de armazenamento, quando utilizado na concentração de 0,1%, sendo o óleo superior aos fungicidas utilizados, como Bavistin, Dithane M-45 e Blitox-50 (ASTHANA et al., 1989).

Extratos clorofórmicos de folhas de *Tagetes minuta* e etanólicos de folhas de *Vernonia condensata*, foram capazes de proporcionar inibição na germinação de urediniósporos de *Hemillea vastatrix* de até 96% na concentração de 10.000 ppm dos extratos (CATARINO et al., 1990).

Valarini et al. (1994) verificaram que o extrato de *Cymbopogon citratus* obtido de folhas inibiu totalmente o crescimento micelial de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*.

Biswas et al. (1995) constataram que os extratos aquosos de *Adhatoda zeylanica*, em aplicações *in vivo* por meio de pulverizações, se mostraram efetivos no controle de *Phyllactinia corylea*, *Pseudocercospora mori* e *Cerotelium fici*.

Folhas secas de *Lippia alba* (erva cidreira brasileira), em contato com suspensão de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, promoveram um aumento do comprimento e da largura dos tubos germinativos formados, bem como a inibição da formação de apressórios, e substâncias solúveis em etanol exerceram efeito fungistático *in vitro* (SANTOS, 1996).

Extratos das plantas *Viscum álbum* e *Hedera helix* aplicados em *Cotoneaster watereri* inibiram a infecção bacteriana causada por *Erwinia amylovora*, além de estimular o metabolismo de fenóis, juntamente com a indução de atividades enzimáticas de peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia liase (MOSCH et al., 1996).

Schwan-Estrada et al. (1998) constataram que o extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* inibiu totalmente o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum graminicola* e *Phytophthora* sp. e parcialmente o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Alternaria alternata*; alterou morfológicamente o desenvolvimento de *C. graminicola*, aumentando a germinação e o comprimento dos tubos germinativos e reduzindo a formação de apressórios. Verificaram também que as frações presentes no óleo essencial e no extrato bruto mostraram-se fungitóxicos a *C. graminicola*.

Stangarlin et al. (1999) estudaram o efeito do extrato bruto de *E. citriodora* sobre *C. graminicola* e observaram que ocorreu um estímulo da germinação de esporos e redução de até 34% na formação de apressórios em concentrações do extrato acima de 10%.

Diniz et al. (2000), em trabalho realizado *in vitro* com óleos vegetais de *Artemisia dracuncululus*, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorona*, *Menta piperita* var. *citrata* e *Ocimum basilicum* contra *Myrothecium verrucaria* conseguiram uma redução de 100% no crescimento micelial desse fungo com óleo de *Artemisia dracuncululus*, *Thymus vulgaris* e *Menta piperita* var. *citrata*, a 2%. Enquanto que para *Origanum majorona* e *Ocimum basilicum* foi necessária a concentração de 20% para inibição total do crescimento micelial desse fungo.

O efeito do extrato bruto e óleo essencial das plantas medicinais *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Ageratum conizoides* e *Achillea millefolium* foi estudado para inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Didymella bryoniae*, onde observou-se que todos os extratos tiveram efeito inibitório e que *A. conizoides* foi o mais efetivo, inibindo 95% do crescimento na concentração de 50%. Os óleos essenciais de *E. citriodora*, *C. citratus*, *A. conizoides* promoveram 100% de inibição do crescimento micelial e germinação de esporos (FIORI et al., 2000).

Óleo essencial e extrato de pimenta longa (*Piper aduncum*) foram testados *in vitro* para o controle de *Ralstonia solanacearum*, raças 1 e 2, onde verificou-se a formação do halo de inibição do crescimento bacteriano em todas as estirpes avaliadas das raças 1 e 2 na diluição de 1:1, tanto para o óleo essencial quanto para o extrato etanólico dessa planta, mostrando-se assim produtos com potencial para controle destas raças da bactéria *Ralstonia solanacearum* (VÉRAS & YUYAMA, 2001).

Os efeitos antifúngicos e fungicidas do óleo de hyssop (*Hyssopus officinales*) foi estudado em uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo*. O crescimento micelial dos fungos *Pyrenophora avenae* e *Pyricularia oryzae* foi completamente inibido por 0,4% do óleo. Para o tratamento *in vivo* no controle do oídio da cevada e da maçã ocorreu um efeito variável no controle entre os tratamentos, sugerindo que esse resultado pode ser devido à volatilização de componentes do óleo, o que não ocorre *in vitro* (LETESSIER et al., 2001).

Becker (2003), em trabalhos realizados em pepino contra mancha angular causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, constatou que extratos aquosos brutos de capim limão inibiu completamente o crescimento bacteriano, a partir da concentração de 20% e a carqueja, a partir de 25 %.

Avaliou-se o controle *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* mediante o uso de extrato aquoso de quatro genótipos de cúrcuma provenientes de cultivos de Jaboticabal-SP, Mara Rosa-GO, Maringá-PR e Mercedes-PR. O extrato de cúrcuma causou inibição total do crescimento da bactéria, na concentração de 10%, para o material proveniente de Mercedes, enquanto que, para a cúrcuma de Jaboticabal, houve controle total a 15% e o de Mara Rosa a 20% (KUHN, 2003).

Pretorius et al. (2003) estudaram, *in vitro*, os extratos de 26 espécies de plantas coletadas na África do Sul com potencial para inibir o crescimento de cinco

bactérias fitopatogênicas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganense* pv. *michiganense*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). Todos os extratos inibiram o crescimento de uma ou mais das cinco bactérias testadas, com graus diferentes. O extrato bruto de *Acacia karros* e *Elephantorrhiza elephantina* inibiram o crescimento de quatro bactérias, enquanto que *Euclia crispa*, *Acacia eriolola*, *Senna italica* e *Buddleja saligna* inibiram o crescimento das cinco bactérias. Destes extratos brutos, *Euclia crispa* foi ligeiramente superior em relação aos demais e também superior comparado ao produto bactericida comercial, dimethyl dodecyl amonium chloride (DDAC).

Dhingra et al. (2004) avaliou o efeito do óleo essencial de *Brassica rapa* na supressão do crescimento *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, na redução da colonização saprofítica no solo, e no tombamento e requeima de plântulas, utilizando feijão vagem como planta indicadora. O crescimento *in vitro* de *R. solani* foi completamente inibido na concentração de 50 ml L⁻¹, a colonização saprofítica do substrato foi drasticamente reduzida para 45% , 24 h após o tratamento e a irrigação de solos infestados por *R. solani* com água contendo o óleo essencial resultou em 95% de controle do tombamento e requeima em mudas de feijão-vagem.

Os efeitos inibitórios, *in vitro*, de óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L., *Allium cepa* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha piperita* L. e *Origanum vulgare* L., foram avaliados sobre o desenvolvimento dos fungos *Fusarium* sp.; *Aspergillus ochraceus* W.; *Aspergillus flavus* L. e *Aspergillus niger*. O óleo essencial do orégano inibiu o desenvolvimento dos fungos testados nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 mg mL⁻¹ exceto o fungo *A. niger* que teve o seu desenvolvimento micelial inibido a partir da concentração de 1000 mg mL⁻¹. Os óleos *R. officinalis*, *A. cepa*, *O. basilicum* e *M. piperita* tiveram um efeito pronunciado a partir da concentração de 1500 mg mL⁻¹ (PEREIRA et al., 2006).

A atividade de citral, óleo essencial e hidrolato de *Cymbopogon citratus* na indução de resistência em plantas de tomate contra *Alternaria solani*, pela avaliação da atividade de peroxidase, foi constatada às 12 e 48 horas após a inoculação maior atividade dessa enzima em relação ao tratamento controle com água e plantas não inoculadas (BALBI-PEÑA et al., 2007).

O presente trabalho objetivou verificar o potencial de tinturas etanólicas e óleos essenciais de plantas medicinais, piraclostrobina e ASM no controle do cretamento bacteriano comum e na indução da resistência do feijão vagem cultivar Bragança . Para isso, a tese foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro intitulado: “Ação de tinturas etanólicas e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência ao cretamento bacteriano comum”, redigido conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica*, e o segundo capítulo intitulado: “Atividade de acibenzolar-S-metil e piraclostrobina na indução de resistência de feijão vagem ao cretamento bacteriano comum”, redigido conforme as normas da revista *Tropical Plant Pathology*.

CAPÍTULO I

AÇÃO DE TINTURAS ETANÓLICAS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS NA INDUÇÃO DE RESISTENCIA AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM

Ação de tinturas etanólicas e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência ao crestamento bacteriano comum do feijoeiro

Sandra Cristina Vigo-Schultz¹, Antonio Carlos Maringoni¹, Renata de Cássia Camara¹ & Giuseppina P.P. Lima²

¹Departamento de Produção Vegetal-Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP. CP 237, Botucatu, SP, 18610-307. ²Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biologia, UNESP. CP 1510 Botucatu, SP, 18618-000 Autor para correspondência: Sandra Cristina Vigo-Schultz <sandracvigo@yahoo.com.br>

¹ bolsista CNPq

Data de chegada:

Aceito para publicação:

Vigo-Schultz, S.C., Maringoni, A.C., Câmara, R. de C., Lima, G.P.P. Ação de tinturas etanólicas e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência ao crestamento bacteriano comum do feijoeiro. Summa Phytopathologica,

RESUMO

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes nas tinturas etanólicas ou em óleos essenciais de plantas podem representar, ao lado da indução de resistência, mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de tinturas etanólicas de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp. e *Hedera helix* e óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Cinnamomum zeylanicum* na atividade *in vitro*, *in vivo* e na produção de proteínas na indução de resistência, em plantas de feijão vagem cultivar Bragança. Os resultados obtidos demonstraram que as tinturas de *L. alba* e *L. sidoides* e os óleos essenciais apresentaram atividade *in vitro* aos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, todas as tinturas etanólicas ensaiadas apresentaram menores valores do progresso da doença (AACPD), em relação à testemunha, merecendo destaque a tintura etanólica de *L. alba*, que estavam correlacionadas com os maiores teores de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais, evidenciando uma possível indução de resistência. Os óleos essenciais não apresentaram diferença na AACPD e nem a indução de proteínas.

Palavras-chave adicionais: *Phaseolus vulgaris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, resistência sistêmica adquirida.

Vigo-Schultz, S.C., Maringoni, A.C., Câmara, R. de C., Lima, G.P.P. Action of medicinal plants alcohol extracts and essential oils on resistance induction to the bean common bacterial blight. *Summa Phytopathologica*,

ABSTRACT

Additionally to resistance inducers, the exploitation of secondary compounds biological activity present in plants alcohol extracts or essential oils could represent an alternative potential way to control diseases in cultivated plants. This study aimed to evaluate the potential of *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp. and *Hedera helix* alcohol extracts and, *Rosmarinus officinalis* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils on *in vitro* and *in vivo* activity, and protein production on resistance induction in snap beans, Bragança cultivar. Results showed *in vitro* activity against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* for *L. alba* and *L. sidoides* extracts, and essential oils. Although all alcohol extracts have showed the lowest area under the disease progress curve (AUPDC) values compared to control treatment, *L. alba* extract must be highlighted due to its correlation to the highest polyphenoloxidases, peroxidases and total soluble proteins values which evidences a possible resistance induction. Essential oils did not show difference on AUPDC nor protein induction.

Additional keywords: *Phaseolus vulgaris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, acquired systemic resistance.

O feijoeiro é afetado por vários tipos de patógenos que causam doenças e acarretam perdas significativas na produção. Entre estes o horticultor têm se preocupado com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento bacteriano comum, que possui grande importância para a cultura devido sua distribuição quase generalizada, e os danos severos na produtividade (02).

Os primeiros sintomas surgem na forma de manchas aquosas, com crescimento irregular, na face inferior dos folíolos, tornando-se de coloração parda e aspecto necrótico, circundadas por halo de tecido amarelo, coalescendo e originando o crestamento. A

disseminação ocorre através de sementes infectadas e respingos de água da chuva ou irrigação. O clima úmido, com temperaturas altas (28 °C), favorece o desenvolvimento da doença, ocasionando grandes perdas na cultura (03).

Como o controle da doença em condições favoráveis é difícil, recomenda-se manejo integrado, utilizando várias medidas de controle que incluem o uso de cultivares resistentes, rotação de culturas e sementes certificadas livres do patógeno (12); aração profunda para incorporação de restos culturais infectados, bom preparo e fertilidade do solo, época de semeadura e manejo da irrigação (14). A eficácia do controle químico do cretamento bacteriano comum do feijoeiro, através de pulverização das plantas com produtos bactericidas, tem sido de pouca magnitude nas lavouras, devido à baixa eficiência destes (03).

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas e o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência (21). A resistência induzida tem sido demonstrada em diversas espécies de plantas, ocorrendo em resposta ao tratamento com elicitores, que podem ser bióticos ou abióticos, dentre os quais pode-se citar os extratos vegetais, os óleos essenciais, produtos químicos, fungos, entre outros (24). Este tipo de controle provavelmente se tornará um componente importante no manejo de doenças, principalmente daquelas onde os métodos atuais mostram-se pouco efetivos (18).

A seqüência de eventos relacionados à indução e expressão da resistência ou resposta de defesa inicia-se com o reconhecimento pelo hospedeiro de alguma característica química ou estrutural do patógeno, ou agente de estresse ou dano associado com a invasão. Esta percepção resulta na produção ou liberação de um composto sinalizador que é responsável pela indução da resposta de defesa da planta (08).

Os mecanismos ativos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves envolvidas na síntese de lignina e fitoalexinas, como a peroxidase, a polifenoloxidase e compostos fenólicos (19).

As peroxidases e polifenoloxidases são enzimas encontradas em todas as plantas, em muitos fungos e bactérias aeróbicas. Frequentemente, aumentam sua atividade em resposta ao estresse e um de seus principais papéis parece ser o de promover a proteção à célula. Também podem participar de outras reações oxidativas em frutos e hortaliças, como mudança de cor,

degradação de clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis e do ácido indol acético e biossíntese de lignina (26).

Trabalhos desenvolvidos com extratos ou óleo essencial, obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial delas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação direta sobre os patógenos, inibindo seu crescimento, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando compostos com característica de eliciadores. No entanto, não foram realizadas a separação e caracterização das frações biologicamente ativas, nem a determinação do alvo de atuação desses compostos, ou seja, se sobre o patógeno apenas ou sobre a planta hospedeira, por meio da indução de resistência (22).

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com os objetivos de estudar o efeito das tinturas vegetais de *Lippia alba* (erva cidreira), *Lippia sidoides* (alecrim pimenta) *Mikania glomerata* (guaco), *Equisetum* sp. (cavalinha) e *Hedera helix* (hera) e dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) no crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *phaseolis*, na indução de resistência ao crescimento bacteriano comum em feijão vagem cultivar Bragança, bem como a produção de peroxidase, polifenoloxidase e proteínas solúveis totais em plantas tratadas e não tratadas com a aplicação dos produtos vegetais.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolado bacteriano

Foram utilizados dois isolados bacterianos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (101D e UFV50) da coleção do departamento de Produção Vegetal, FCA/Unesp e do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, que encontram-se preservados pelo método de dessecação em tiras de papel de filtro e mantido sob refrigeração.

Os isolados bacterianos foram repicados em meio de cultura nutriente líquido (extrato de carne – 3,0 g; peptona – 5,0 g; água destilada – 1000 mL) durante 24 h, a 28 °C, e transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura NSA (extrato de carne – 3,0 g; peptona – 5,0 g; ágar – 15 g; água destilada – 1000 mL; acrescido de sacarose – 5,0 g), e incubados por 72 h, à temperatura de 28 °C.

Obtenção de tinturas etanólicas e óleos essenciais de plantas medicinais

As plantas medicinais, produzidas no Campus da UNESP em Botucatu, foram coletadas e utilizadas na forma de tintura vegetal. A tintura vegetal foi obtida através de maceração de folhas frescas (200 g) em álcool etílico 70% (1000 mL) por 7 dias, em temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, a tintura etanólica foi filtrada em gaze e em papel filtro, Whatman nº 01, e preservadas sob refrigeração para utilização nos diferentes ensaios.

Os óleos essenciais foram obtidos da indústria Bioessência Produtos Naturais Ltda, localizada à Avenida Industrial, 827, Distrito Industrial, Barra Bonita, São Paulo.

Atividade antimicrobiana *in vitro* das tinturas e óleos essenciais

Visando verificar a ação *in vitro* das tinturas e óleos essenciais das plantas medicinais dois isolados de Xap (101D e UFV50) foram cultivados em 50 mL de nutriente líquido, durante 48 h, a 28 °C. Seguida a incubação, os isolados foram transferidos individualmente para recipientes contendo meio de cultura NSA fundente, a 45 – 50 °C, na proporção de 1 parte de suspensão bacteriana para 9 partes de meio de cultura. Essa mistura foi transferida para placas de Petri (20 mL), deixando-a solidificar sob condições ambientes. Após a solidificação foram realizados perfurações (pocinhos) de 5 mm de diâmetro no meio de cultura e acrescentado 40 µL das tinturas e óleos essenciais nas concentrações de 0, 1, 5, 10, 50 e 100%. Álcool etílico 70% foi utilizado como testemunha para as tinturas e água destilada contendo leite em pó desnatado (18 g L⁻¹) como testemunha para os óleos essenciais (09).

As placas foram incubadas a 28 °C, durante 48 h e, em seguida, aferidos em milímetros os diâmetros perpendiculares dos halos de inibição formados ao redor dos “pocinhos”. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada uma representada por uma placa de Petri.

Indução de resistência em feijão vagem ao crestamento bacteriano comum

Sementes de feijão vagem, cultivar Bragança, foram semeadas em vasos de 3 L de capacidade contendo substrato autoclavado constituído de um terço de areia grossa, um terço de solo e um terço de esterco de curral curtido, acrescido de calcário dolomítico e adubo químico conforme a análise de solo (27), sob condições de casa de vegetação. Foram semeadas 5 sementes de feijão vagem cultivar Bragança por vaso e, após a germinação, selecionou-se as plantas com desenvolvimento normal, deixando 3 plantas por vaso. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 5 repetições, esquema fatorial 5 x 3 para as tinturas etanólicas e 4 x 2 para os óleos essenciais.

As tinturas etanólicas de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp. e *Hedera hélix* foram pulverizados nas folhas das plantas, nas concentrações de 0, 1, 5, 10 20%. Os óleos essenciais de alecrim e canela foram diluídos em leite em pó desnatado (09) e pulverizados nas folhas da plantas de feijão vagem nas concentrações de 0,5% para o óleo de alecrim e 0,1% para o óleo de canela, baseadas em pré-testes de fitotoxicidade para feijão vagem. Neste ensaio utilizou-se testemunha água contendo leite em pó desnatado. Para tal, foi utilizado um pulverizador manual com 1,5 litros de capacidade e bico de pulverização do tipo leque.

Os tratamentos para os extratos etanólicos foram: pulverização 5 dias antes da inoculação, 5 dias antes e 5 dias após a inoculação e 5 dias após a inoculação. Para os óleos essenciais foram: pulverização 5 dias antes da inoculação e 5 dias após a inoculação.

Foi realizada a inoculação nas folhas primárias, aos quinze dias após a emergência das plantas, para os tratamentos com extratos etanólicos e inoculação nos folíolos da primeira, segunda e terceira folhas trifolioladas, aos vinte e cinco dias após a emergência das plantas, para os tratamentos com óleos essenciais através do método de agulhas múltiplas (01), com o isolado de Xap UFV 50, na concentração de 10^8 ufc mL⁻¹.

A avaliação da severidade de sintomas da doença nos folíolos foi realizada aos 12, 15 e 18 dias após a inoculação, através da escala de notas de 1 a 5, conforme Maringoni et al. (13): 1 – sem sintoma, 2 – até 25% de amarelecimento e/ou necrose na área inoculada, 3 – 26 a 50% de amarelecimento e/ou necrose na área inoculada, 4 – 51 a 75% de amarelecimento e/ou necrose na área inoculada, 5 – acima de 75% de amarelecimento e/ou necrose na área

inoculada. Com os resultados obtidos nas avaliações foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), conforme (20), e os valores foram submetidos à análise de variância e a testes de separação de médias, com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (23).

Análises bioquímicas

Para as análises de polifenoloxidase, peroxidase e teor de proteínas foi utilizado ensaio em casa de vegetação com vasos, conforme descrito no item anterior.

Foram retiradas uma folha primária de cada repetição de plantas não inoculadas e inoculadas (5 dias após os tratamentos), sendo no total 5, coletadas em cinco épocas (concomitantemente, 3, 5, 8 e 10 dias após o tratamento). Para tanto foram pulverizados nas folhas os extratos etanólicos na concentração de 20% e os óleos essenciais de alecrim e canela, nas concentrações de 0,5 e 0,1%, respectivamente.

As amostras após pesagem, foram embaladas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram processadas para as análises, através da trituração em 5 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7 à temperatura entre 0 e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e centrifugação do homogeneizado obtido, por 15 min a 10000 g (peroxidase (POD) e proteínas solúveis totais). Para a atividade de polifenoloxidase (PFO) foi utilizado tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 na trituração. O sobrenadante foi armazenado em frascos de vidro, mantidos em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para ser utilizado como extrato nas análises.

O teor de PFO foi determinado de acordo com o método de Cano et al. (06) modificado. A reação ocorrida, em banho-maria, entre 0,3 mL do extrato e 1,85 mL de solução de catecol (pyrocatechol 0,1 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0), durante 30 min, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi interrompida após a adição de 0,8 mL de ácido perclórico a 5% (HClO_4). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 395 nm. O teor de PFO foi obtido aplicando-se a fórmula abaixo, calculando-se em U.A. g^{-1} massa fresca min^{-1} .

$$\text{Fórmula: PFO} = [(L / T) \times 1000] / [(P \times A_m) / VT]$$

Onde: PFO = atividade de polifenoloxidase

L = leitura do espectrofotômetro (Abs.)

T = tempo de reação (min)

1000 = unidade de enzima (fator)

P= peso da amostra (mg)

Am= alíquota do extrato (mL)

VT= volume de tampão para homogenização da amostra (mL)

O teor de POD foi determinado pela reação dos extratos com as soluções A (20 mM de H₂O₂ + tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7) e B (4mM de aminoantipirina em 10 mM de fenol) durante 5 min a 30 °C, parando-se a reação com 2 mL de álcool etílico absoluto, fazendo-se em seguida a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 505 nm (11). O teor de peroxidase foi calculado com o emprego da fórmula descrita abaixo, calculando-se em $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$ decomposto g^{-1} massa fresca min^{-1} .

$$\text{Fórmula: } \text{POD} = [(L \times V_t) / (6,58 \times T \times V_e)] / [(P \times V_e) / VT]$$

Onde: POD = atividade da peroxidase

L = leitura do espectrofotômetro (Abs.)

V_t = volume total da amostra (mL)

T = tempo de reação (min.)

V_e = volume utilizado do extrato (mL)

P= peso da amostra (mg)

VT= volume de tampão para homogenização da amostra (mL)

O teor de proteínas totais solúveis foi determinado pelo método de Bradford (04), através da reação entre uma alíquota do extrato vegetal e 5 mL do reativo de Bradford (100 mg de brilhante Blue G + 50 mL de etanol 95% + 100 mL H₃PO₄ 85% + água destilada q. s. p. 1 L), durante 5 min, realizando-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores obtidos na leitura foram substituídos na equação da curva de eficiência (caseína como padrão) e expressos em mg proteína g^{-1} massa fresca.

$$\text{Equação da reta: } y = (0,0257 + 0,0041 x) / V_e$$

y = leitura do espectrofotômetro

x = teor de proteína

V_e = peso da massa fresca utilizada

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as tinturas etanólicas estudadas, as de *Lippia alba* e *Lippia sidoides*, na concentração de 100%, e a de *L. alba*, na concentração de 50%, promoveram a formação de halo de inibição ao isolado 101 D, enquanto que para o isolado UFV 50, apenas a tintura etanólica de *L. sidoides*, nas concentrações de 50 e 100%, promoveu a formação de halos. As demais tinturas avaliadas, em todas as concentrações, não foram capazes de inibir o crescimento dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ensaiados. Esses resultados foram contrários àqueles obtidos por Morais et al. (15), que observaram a ação inibitória *in vitro* de tinturas etanólicas *Lippia alba* e de *Equisetum* spp. à cinco isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Conforme esses autores, houve variação na sensibilidade dos isolados às tinturas etanólicas avaliadas, pois o isolado Feij-20, o mais sensível, com a formação de maior halo de inibição, sendo este resultado concordante com os daqui descritos, pois o isolado 101D apresentou maior sensibilidade *in vitro* quando comparado com o isolado UFV 50.

Estudos conduzidos por Vigo-Schultz et al. (29) demonstraram a ação inibitória *in vitro* do extrato etanólico de *M. glomerata* a *X. campestris* pv. *campestris* nas concentrações a partir de 250 mg L⁻¹. Resultados semelhantes eram esperados no presente trabalho, com a tintura etanólica dessa espécie vegetal, porém não foram constatadas atividades inibitórias aos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* aqui avaliados. .

Os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Cinnamomum zeylanicum* apresentaram ação inibitória *in vitro* aos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ensaiados. Foi observado a presença de halos de inibição para *R. officinalis* a partir da concentração de 1%, e para o isolado UFV 50, a partir da concentração de 5%. Pesquisas desenvolvidas principalmente com fungos de pós colheita em banana, evidenciaram a redução no peso micelial na presença de 0,3% v/v de óleo de *C. zeylanicum*, devido a presença dos compostos antimicrobianos cinnamaldeído e eugenol (18).

Com relação ao tratamento das plantas de feijoeiro com as diferentes tinturas etanólicas e óleos essenciais nas concentrações avaliadas e nos diferentes períodos de aplicação, evidenciaram que todas as tinturas etanólicas apresentaram efeito no controle do crescimento bacteriano comum, sendo que as concentrações de 5 e 20% de *L. alba* (Tabela 1),

5, 10 e 20% de *L. sidoides* e *M. glomerata* (Tabelas 2 e 3), 10 e 20% de *Equisetum* sp. (Tabela 4) e 5 e 20% de *H. helix* (Tabela 5) foram as que propiciaram os menores valores da AACPD. Os óleos essenciais não evidenciaram essa ação no controle do crestamento bacteriano comum (Tabela 6). Para o período de aplicação de *L. alba*, os menores valores de AACPD observados foram aos cinco dias antes da inoculação (Tabela 1), para *M. glomerata* aos cinco dias antes e cinco dias após a inoculação (Tabela 3) e para *H. helix*, onde houve interação entre tratamentos e épocas de aplicação, os menores valores de AACPD foram observados aos cinco dias antes (concentração de 5%) e cinco dias antes e após a inoculação (concentração de 20%) (Tabela 5). Com relação as tinturas de *L. sidoides* e *Equisetum* sp. e os óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. zeylanicum* (Tabelas 2, 4 e 6) não foram observadas diferenças entre os períodos de aplicação desses produtos, para os valores de AACPD observados.

Embora Paixão et al. (16) tenham observado redução na severidade do crestamento bacteriano comum em folíolos de feijão vagem, híbrido Flórida, pulverizados com as tinturas etanólicas de *L. alba*, nas concentrações de 5 e 10% e não com a tintura de *Equisetum* sp., os resultados aqui observados concordam parcialmente com esses autores pois os valores da AACPD foram relativamente próximos entre os tratamentos.

Com relação a *M. glomerata*, Vigo-Schultz et al. (29) observaram que extrato etanólico desta planta não ativou o processo de resistência em plantas de couve-flor à podridão negra, sendo este extrato com ação direta sobre o patógeno.

Nos ensaios com óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. zeylanicum* não se constataram diferenças da AACPD em relação à testemunha água e a testemunha água + leite em pó. Isto pode ser devido à baixa concentração dos óleos em relação às tinturas etanólicas, já que em pré-teste realizado observou-se um efeito tóxico dos mesmos em plantas de feijão vagem, não sendo fitotóxicos nas concentrações em que foram aqui ensaiadas. Tworkoski (28) observou que o óleo essencial de *C. zeylanicum*, na concentração de 5%, teve alta atividade herbicida sobre as plantas invasoras *Ambrosia artemisifolia*, *Chenopodium álbum* e *Sorghum halepense*, pois causou a morte das mesmas, após dois dias da aplicação.

Com relação à atividade enzimática, verifica-se maior produção de polifenoloxidase e proteínas solúveis totais para as plantas tratadas com as tinturas etanólicas de *L. alba*, *L. sidoides*, *M. glomerata*, *Equisetum* sp. e *H. helix* (Figuras 1 a 5), com o pico de produção respectivamente aos oito e cinco dias após a pulverização. Já para a peroxidase, incrementos

na produção dessa enzima foram observados principalmente nas plantas pulverizadas com as tinturas etanólicas de *L. alba*, *M. glomerata* e *Equisetum* sp. (Figuras 1, 3 e 4).

Os óleos essenciais empregados não acarretaram aumentos contrastantes em relação ao tratamento testemunha, quanto a produção de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais (Figuras 6 e 7).

Evidências apontam que as tinturas etanólicas aqui estudadas tiveram ação indutora de resistência do feijão vagem ao crestamento bacteriano comum, visto pelas alterações na produção das enzimas e proteínas solúveis avaliadas e pelos menores valores da AACPD observados. Conforme Kuhn (10), aumento na atividade de peroxidase em plantas de feijão IAC Carioca Tybatã e redução na severidade do crestamento bacteriano comum foram observados em plantas tratadas com *Bacillus cereus*. Já Campos et al. (05) constataram correlações positivas entre as atividades de peroxidase e polifenoloxidase em plantas de feijão tratadas com um isolado avirulento de *Colletotrichum lindemuthianum*, que propiciou a ativação dos mecanismos de resistência dessas plantas quando inoculadas com um isolado virulento de *C. lindemuthianum*.

As plantas inoculadas com o patógeno desafiante não apresentaram diferença na produção de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais para nenhuma das tinturas etanólicas ou óleos essenciais aqui ensaiados (Figuras 1 a 7). Já Silva et al. (25) observaram um aumento na peroxidase em plantas de tomate tratadas com extratos aquosos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* aos três dias após o tratamento, um dia após a inoculação, onde as plantas tratadas e inoculadas com a bactéria desafiante *Ralstonia solanacearum* apresentaram maior indução de peroxidase em relação a plantas somente tratadas com os extratos aquosos dos cogumelos. Em plantas de pepino tratadas com extrato aquoso de *L. edodes* e desafiadas com *Colletotrichum lagenaria*, Di Piero e Pascholati (07) constataram uma elevação na atividade local e sistêmica de peroxidases no nono e décimo segundo dias após o tratamento, respectivamente (no terceiro e sexto dia após a inoculação do patógeno).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ANDRUS, C.F. A method of testing beans for resistance to bacterial blights. **Phytopathology**, v. 38, p. 757-759, 1948.
02. Barros, B.C.; Oliveira, S.H.F.; Leite, L.G.; Ito, M.F.; Campos, T.B.; Oliveira, C.M.G.; Sanazzaro, A.M.; Castro, J.L. & Pinzan, N.R.. **Manejo integrado de pragas e doenças do feijoeiro**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2000, v. 3, 39p. (Manual Técnico, Série Especial).
03. Bianchini, A.; Maringoni, A.C. & Carneiro, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A & Camargo, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.
04. Bradford, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New Delhi, v. 72, p. 248-254, 1976.
05. Campos, A.D.; Ferreira, A.G.; Hampe, M.M.V.; Antunes, I.F.; Brancão, N.; Silveira, E.P. da; Osório, V.A. e Augustin, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 248-254, 2004.
06. Cano, M.P.; Ancos, B.; Mantallana, M.C.; Cámara, M.; Reglero, G. & Tabea, J.. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, Barking, v. 59, n. 3, p. 411-419, 1997.
07. Di Piero, R.M. & Pascholati, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.243-250. 2004.
08. Johal, C.S.; Gray, J.; Gruis, D. & Briggs, S.P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal Botany**, v. 73 (Supl.1), p. 468-474, 1995.
09. Junqueira, N.T.V.; Chaves, R.C.; Nascimento, A.C.; Ramos, V.H.V.; Peixoto, J.R. & Junqueira, L.P. Efeito do óleo de soja no controle da antracnose e na conservação da manga cv. palmer em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 222-225, 2004.
10. Kuhn, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de**

- crecimento e produção.** 2007, 140 p. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
11. Lima, G.P.P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas, peroxidase e nitrato redutase em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440).** 1994. 84 f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
 12. Lollato, M.A. Manejo de campos de feijão em plantio direto. In: Dia de campo de feijão, 17/18, 2001/2002, Capão Bonito. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, p. 43-49, 2002.
 13. Maringoni, A.C.; Fregonese, C.H.; Tofoli, J.G & Kurozawa, C. Reação foliar e de vagens de feijoeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 412-415, 1993.
 14. Maringoni, A.C. Controle das principais doenças bacterianas e fúngicas do feijoeiro. In: Dia de campo de feijão, 17/18, 2001/2002, Capão Bonito. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, p. 51-59, 2002.
 15. Moraes, L.A.S.; Maringoni, A.C. & Ming, L.C. Atividade de tinturas de plantas medicinais *in vitro* sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, 2002. Suplemento CD-room.
 16. Paixão, G. L. de S.; Seabra Jr, S.; Moraes, L. A. S. de; Biazon, V. L.; Goto, R.; Maringoni, A. C. & Ming, L. C. Atividade de tinturas de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum em feijão vagem. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, 2003. Suplemento CD-room.
 17. Pascholati, S.F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI? **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n.1, p.115-116, 2003.
 18. Ranasinghe, L.; Jayawardena, B. & Abeywickrama, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 208-211, 2002.
 19. Resende, M.L.V.; Nojosa, G.B.A.; Cavalcanti, L.S.; Aguilar, M.A.G.; Silva, L.H.C.P.; Perez, J.O.; Andrade, G.C.G.; Carvalho, G.A. & Castro, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* e *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, San Diego, v. 51, p. 621-628, 2002.
 20. Schneider, R.W.; Williams, R.J. & Sinclair, J.B. Cercospora leaf sport of cowpea: models for estimating yield loss. **Phytopathology**, 66:384-388, 1976.

21. Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28 (suplemento), p. 554 – 556, 2003.
22. Schwan-Estrada, K.R.F. & Stangarlin, J.F. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. & Romeiro, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba SP. FEALQ. 2005. p. 125-138.
23. Silva, F. de A.S. e & Azevedo, C.A.V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4, Orlando: Anais... Orlando: American Society of Agricultural Engineers, p.393-396, 2006.
24. Silva, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*)**. 2007, 109 f. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
25. Silva, R.F., Pascholati, S.F. & Bedendo, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n. 3, p.189-196. 2007.
26. Soares, R. M. **Avaliação da eficácia de *Fusarium* sp. E da indução de resistência por acibenzolar-S-methyl à murcha-de-curtobacterium do feijoeiro**. 2001. 89 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área de concentração Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista/FCA, Botucatu, 2001.
27. Trani, P.E.; Passos, F.A. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas: IAC, 1997, 180 p. (Boletim técnico 100).
28. Tworkoski, T. Herbicide effects of essential oils. **Weed Science**, v. 50, p.425–431, 2002.
29. Vigo-Schultz, S.C.; Stangarlin, J.L.; Franzener, G.; Portz, R.L.; Kuhn, O.J. & Schwan-Estrada, K.R.F. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, 2006.

Tabela 1: Área abaixo da curva do progresso da doença (crestamento bacteriano comum) em folhas de feijão vagem cultivar Bragança submetidas a tratamentos com tintura etanólica de *Lippia alba*.

Concentrações da tintura etanólica (%)	Épocas de aplicação			
	5 dias antes	5 dias antes + 5 dias após	5 dias após	Média
0	22,41	24,15	23,97	23,51 a *
1	22,35	21,12	22,38	21,95 b
5	20,97	20,76	22,20	21,31 bc
10	21,42	22,41	22,80	22,21 ab
20	19,50	20,97	20,85	20,44 c
Média	21,33 b	21,88 ab	22,44 a	

CV (%) 6,20

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Tabela 2: Área abaixo da curva do progresso da doença (crestamento bacteriano comum) em folhas de feijão vagem cultivar Bragança submetidas a tratamentos com tintura etanólica de *Lippia sidoides*.

Concentrações da tintura etanólica	Épocas de aplicação			
	5 dias antes	5 dias antes + 5 dias após	5 dias após	Média
0	21,48	22,44	22,56	22,16 a *
1	22,44	20,55	20,91	21,30 ab
5	20,91	19,44	19,74	20,03 bc
10	19,26	19,56	19,38	19,40 c
20	20,91	19,14	20,46	20,17 bc
Média	21,00 a	20,23 a	20,61 a	

CV (%) 7,28

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Tabela 3: Área abaixo da curva do progresso da doença (crestamento bacteriano comum) em folhas de feijão vagem cultivar Bragança submetidas a tratamentos com tintura etanólica de *Mikania glomerata*.

Concentrações da tintura etanólica (%)	Épocas de aplicação			
	5 dias antes	5 dias antes + 5 dias após	5 dias após	Média
0	27,27	26,91	27,42	27,20 a*
1	26,43	24,45	27,00	25,96 ab
5	25,59	24,24	25,83	25,22 b
10	26,43	25,38	24,57	25,46 b
20	26,19	24,81	25,17	25,39 b
Média	26,38 a	25,16 b	26,00 ab	

CV (%) 5,55

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Tabela 4: Área abaixo da curva do progresso da doença (crestamento bacteriano comum) em folhas de feijão vagem cultivar Bragança submetidas a tratamentos com tintura etanólica de *Equisetum* sp..

Concentrações da tintura etanólica (%)	Épocas de aplicação			
	5 dias antes	5 dias antes + 5 dias após	5 dias após	Média
0	29,94	29,88	29,91	29,91 a*
1	29,82	29,22	29,61	29,55 a
5	29,43	29,49	29,61	29,51 a
10	28,92	28,95	29,79	29,22 ab
20	27,69	28,43	29,18	28,43 b
Média	29,16 a	29,19 a	29,62 a	

CV (%) 2,88

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Tabela 5: Área abaixo da curva do progresso da doença (crestamento bacteriano comum) em folhas de feijão vagem cultivar Bragança submetidas a tratamentos com tintura etanólica de *Hedera helix*.

Concentrações da tintura etanólica (%)	Épocas de aplicação		
	5 dias antes	5 dias antes + 5 dias após	5 dias após
0	23,64 aA*	23,91 aA	23,61 aA
1	22,59 aA	20,79 abA	21,51 aA
5	17,70 bB	20,55 abAB	21,90 aA
10	20,61 abA	21,24 abA	22,29 aA
20	22,62 aA	18,30 bB	20,94 aAB

CV (%) 8,93

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

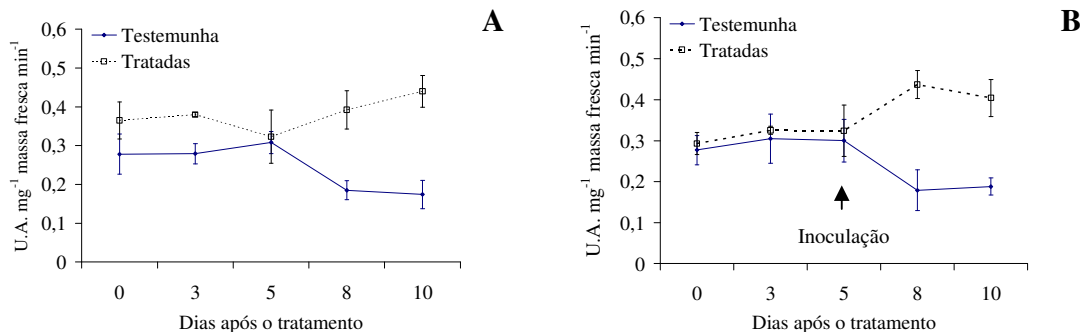
Tabela 6 – Área abaixo da curva do progresso da doença (crestamento bacteriano comum) em folhas de feijão vagem cultivar Bragança submetidas a tratamento com óleos essenciais.

Tratamentos	Épocas de aplicação		
	5 dias antes	5 dias após	Média
Testemunha água	28,53	27,39	27,96 a*
Testemunha água + leite	26,4	26,94	26,67 a
Óleo de <i>Rosmarinus officinalis</i> 0,5%	26,52	27,27	26,89 a
Óleo de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> 0,1%	28,77	28,02	28,39 a
Média	27,55 a	27,40 a	

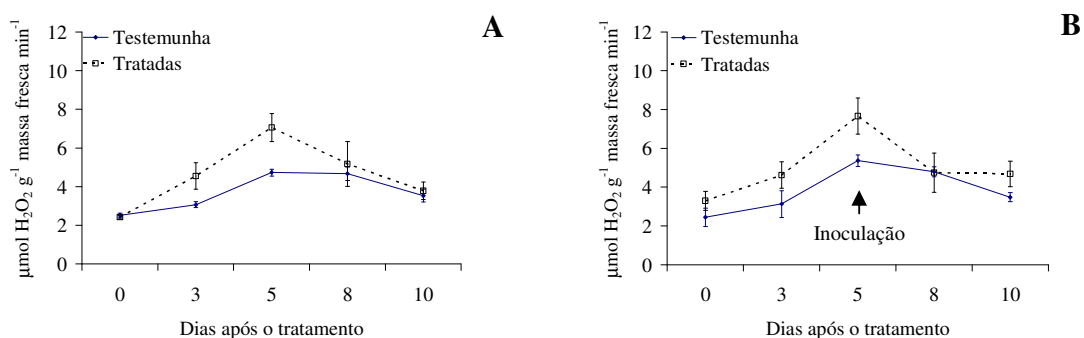
CV (%) 5,75

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

POLIFENOLOXIDASE



PEROXIDASE



PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

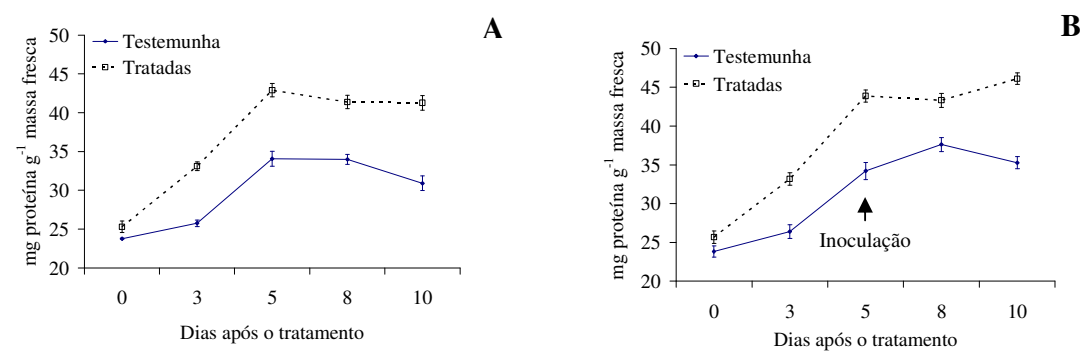
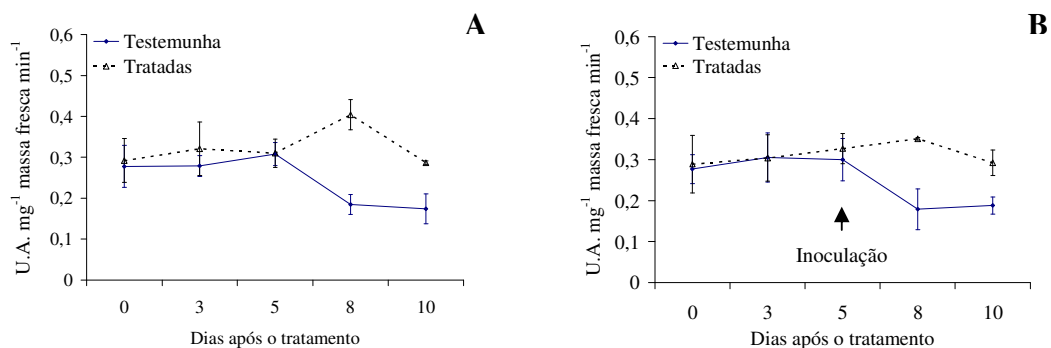
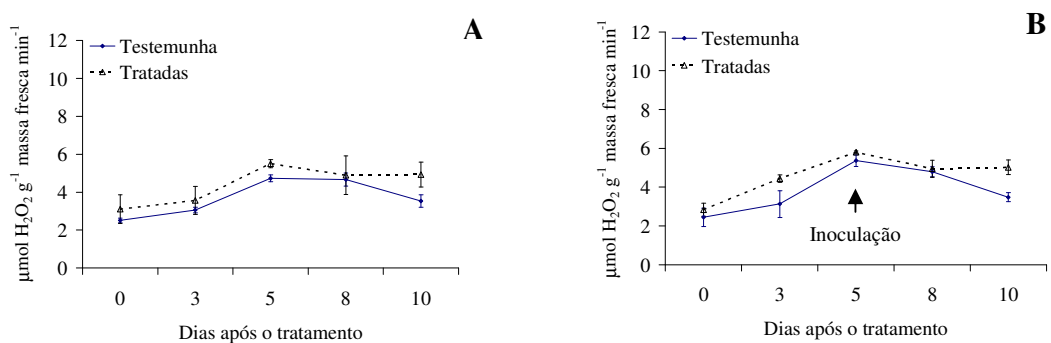


Figura 1 - Teor de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas de feijão vagem cultivar Bragança pulverizadas com tintura etanólica de *Lippia alba* a 20%, não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras indicam a média \pm o erro padrão.

POLIFENOLOXIDASE



PEROXIDASE



PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

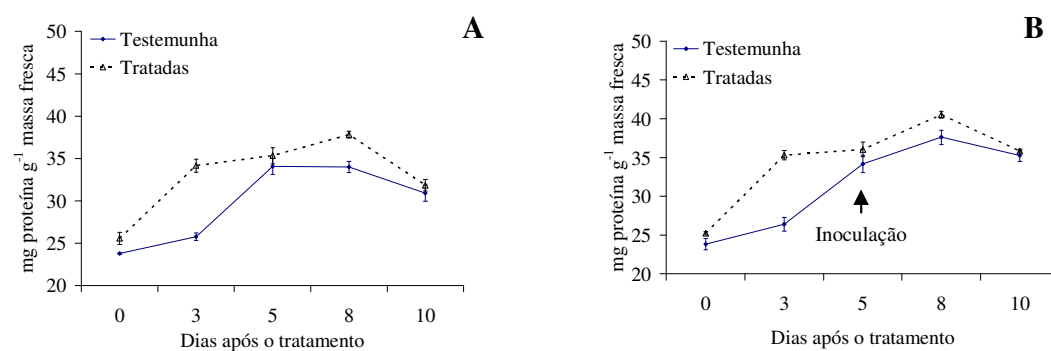
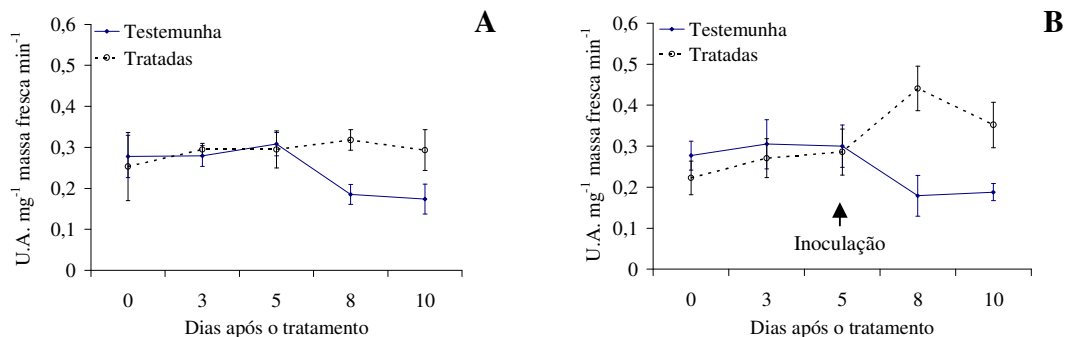
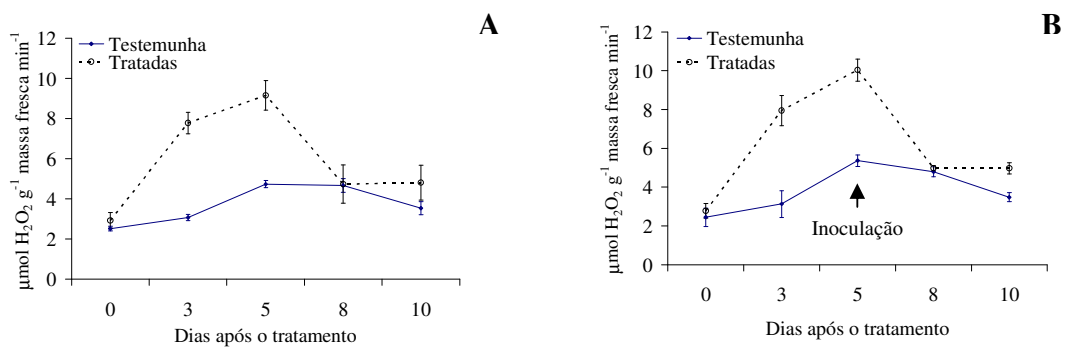


Figura 2 - Teor de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas de feijão vagem cultivar Bragança pulverizadas com tintura etanólica de *Lippia sidoides* a 20%, não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras indicam a média \pm o erro padrão.

POLIFENOLOXIDASE



PEROXIDASE



PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

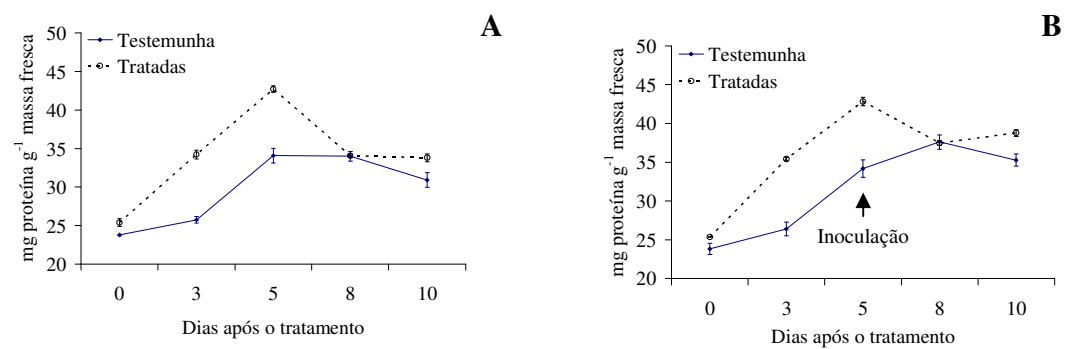
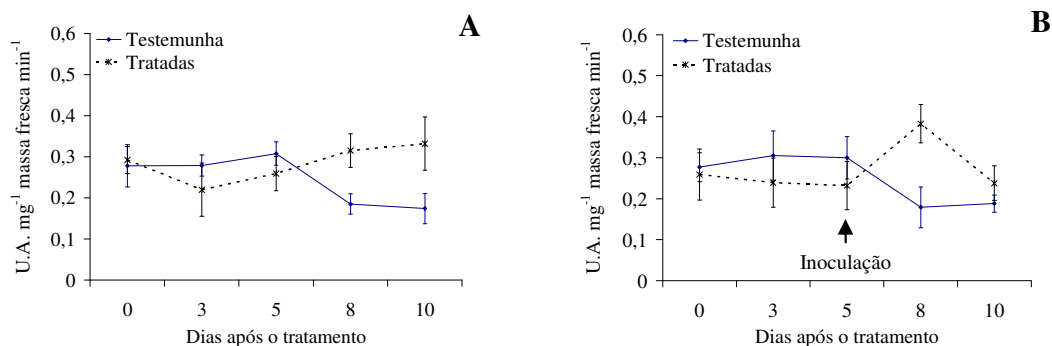
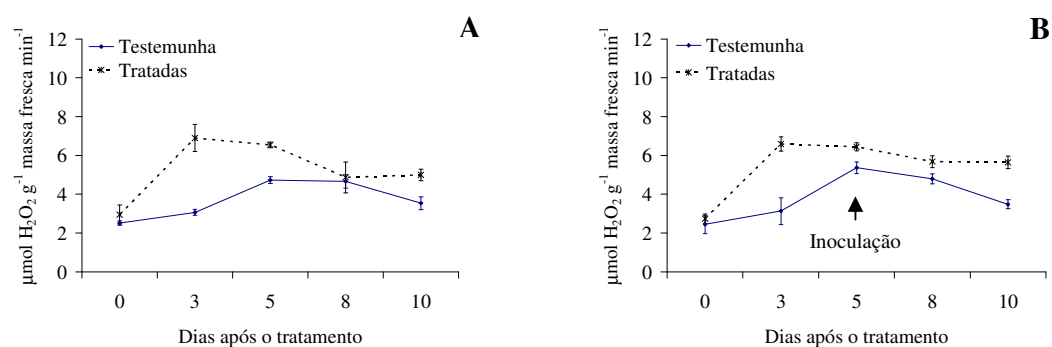


Figura 3 - Teor de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas de feijão vagem cultivar Bragança pulverizadas com tintura etanólica de *Mikania glomerata* a 20%, não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras indicam a média \pm o erro padrão.

POLIFENOLOXIDASE



PEROXIDASE



PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

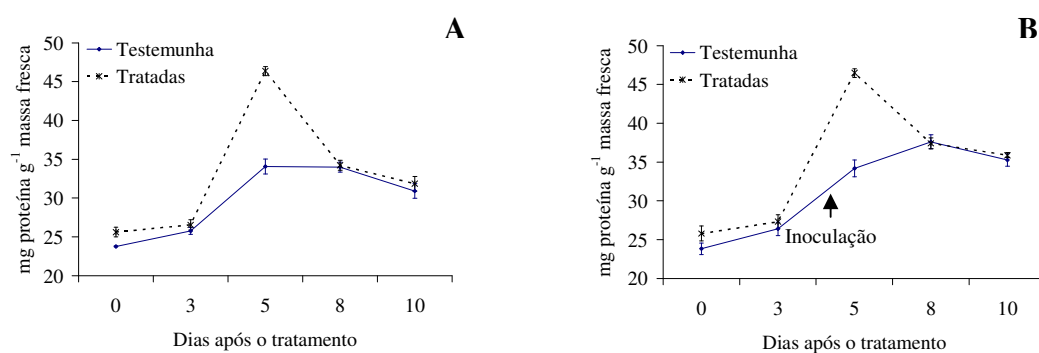
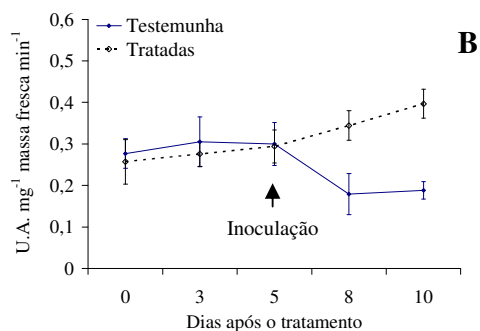
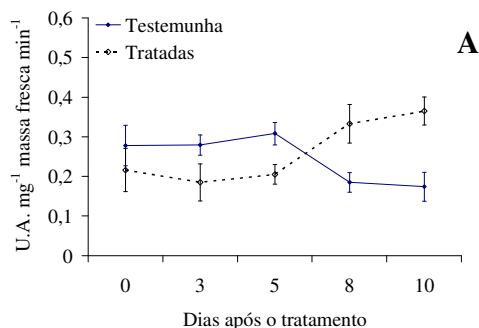
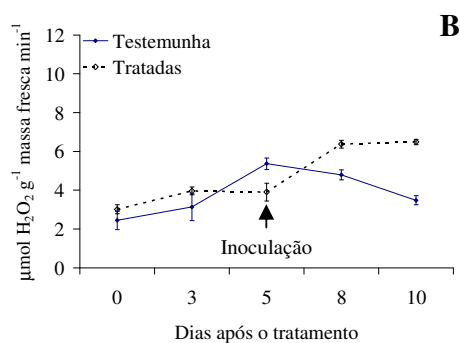
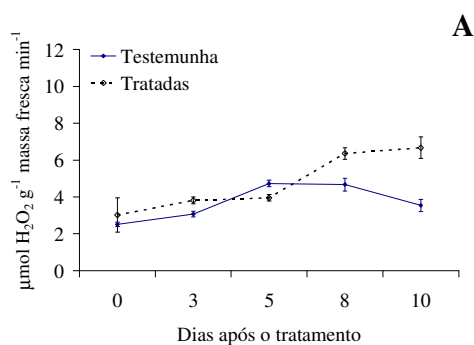


Figura 4 - Teor de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas de feijão vagem cultivar Bragança pulverizadas com tintura etanólica de *Equisetum* sp. a 20%, não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras indicam a média \pm o erro padrão.

POLIFENOLOXIDASE



PEROXIDASE



PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

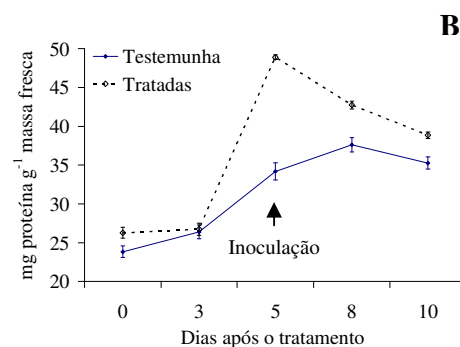
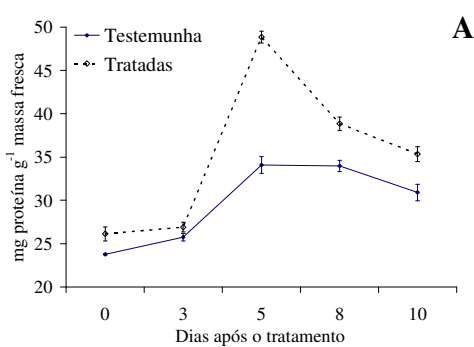
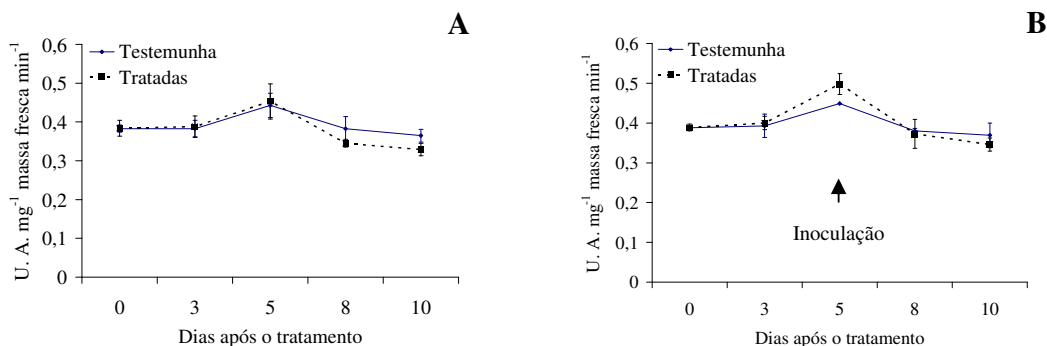
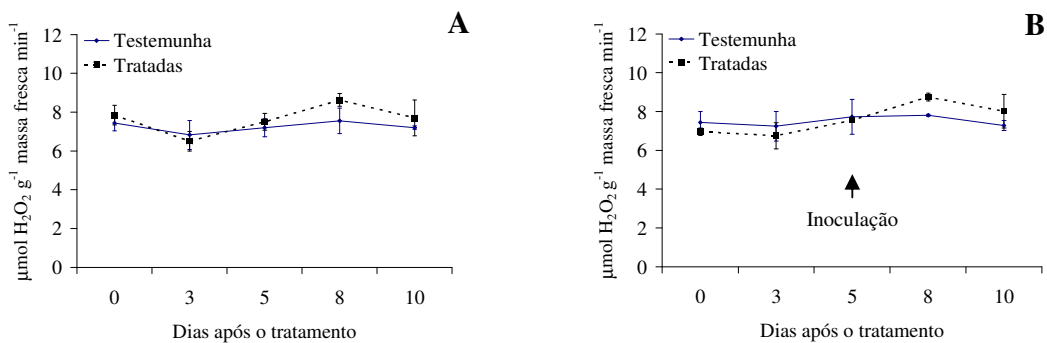


Figura 5 - Teor de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas de feijão vagem cultivar Bragança pulverizadas com tintura etanólica de *Hedera helix* a 20%, não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras indicam a média \pm o erro padrão.

POLIFENOLOXIDASE



PEROXIDASE



PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

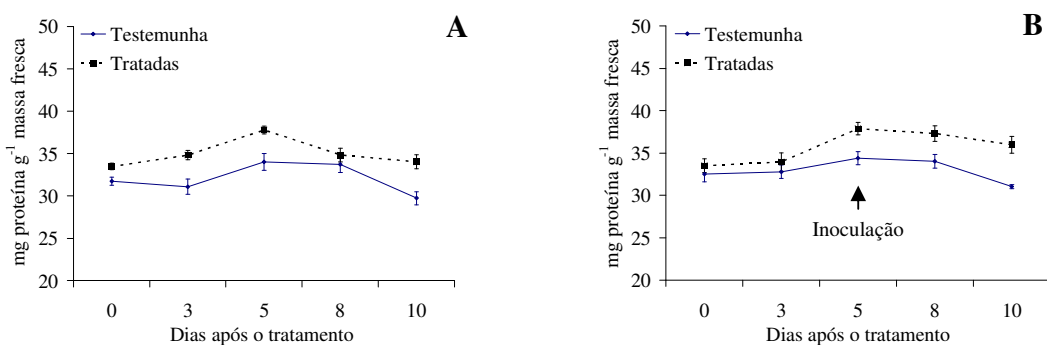
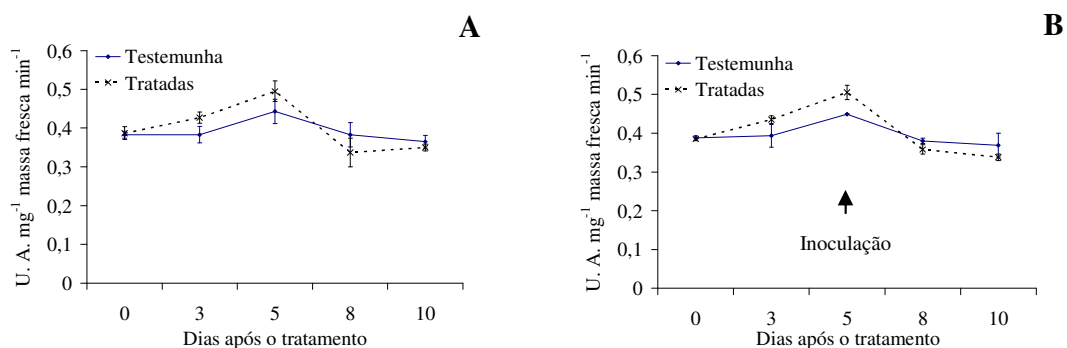
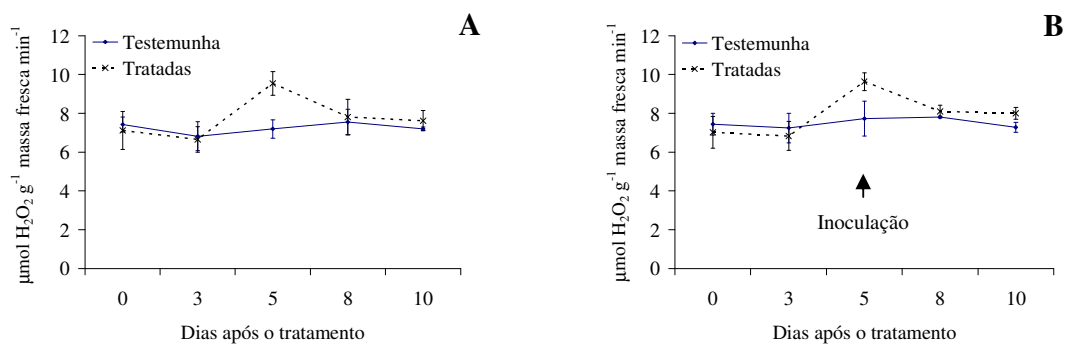


Figura 6 - Teor de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas de feijão vagem cultivar Bragança pulverizadas com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* a 0,5%, não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras indicam a média \pm o erro padrão.

POLIFENOLOXIDASE



PEROXIDASE



PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

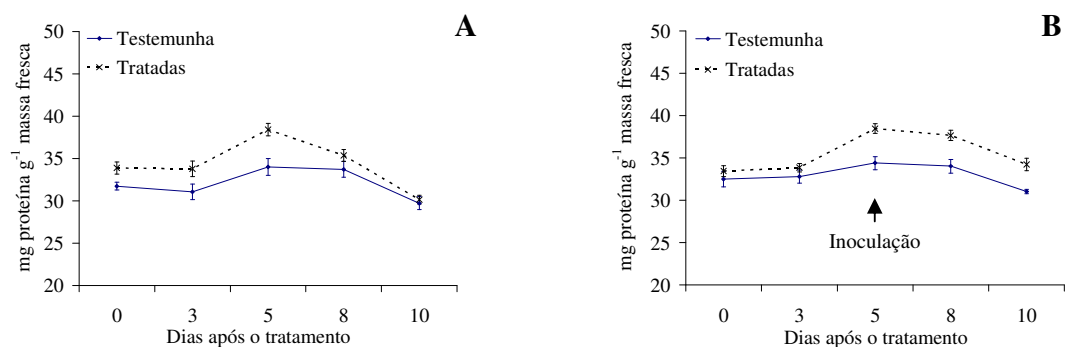


Figura 7 - Teor de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas de feijão vagem cultivar Bragança pulverizadas com óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* a 0,1%, não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras indicam a média \pm o erro padrão.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE PIRACLOSTROBINA NO CONTROLE DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJÃO VAGEM

**Avaliação da Eficácia de Piraclostrobina no Controle do Crestamento Bacteriano
Comum do Feijão Vagem**

**Sandra C. Vigo-Schultz¹, Antonio Carlos Maringoni¹, Renata de Cássia Camara¹ &
Giuseppina P.P. Lima²**

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Caixa Postal 237, CEP 18610-307, Botucatu, SP, e-mail: sandracvigo@yahoo.com.br.

²Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biologia, UNESP, Caixa Postal, 1510, CEP 18618-000, Botucatu, SP.

(Aceito para publicação em ...)

Autor para correspondência: Sandra Cristina Vigo-Schultz

VIGO-SCHULTZ, S. C., MARINGONI, A. C., CAMARA, R. C. & LIMA, G. P. P. Avaliação da eficácia de piraclostrobina no controle do crestamento bacteriano comum do feijão vagem. *Tropical Plant Pathology*...

RESUMO

Ensaio foram conduzidos *in vitro* e sob condições de casa de vegetação com a finalidade de avaliar a ação de diferentes doses (0, 0,0375, 0,0750 e 0,150 mL L⁻¹), de piraclostrobina e uma dose (0,025 g L⁻¹) de acibenzolar-S-metil (ASM), pulverizadas em três épocas (5 dias antes; 5 dias antes e 5 dias após; e 5 dias após a inoculação), sobre o crestamento bacteriano comum, em folhas de feijão vagem cultivar Bragança, e o efeito desses produtos nos teores de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em folhas não inoculadas e inoculadas. A piraclostrobina não inibiu o crescimento do isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* *in vitro*. Em casa de vegetação, às concentrações de piraclostrobina, juntamente com o ASM, reduziram a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) nas plantas tratadas e, para as épocas de aplicação dos produtos, pode-se observar que o menor valor da AACPD ocorreu com cinco dias antes e cinco dias após a pulverização desses. Maiores teores de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais, foram observados nos folíolos das plantas pulverizadas com piraclostrobina e ASM, evidenciando uma possível indução de resistência em plantas de feijão vagem cultivar Bragança.

Palavras-chave adicionais: *Phaseolus vulgaris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, resistência sistêmica adquirida, benzotiadiazole, estrobilurina.

ABSTRACT

Efficacy of Pyraclostrobin on the snap bean to common bacterial blight control

Studies were carried out *in vitro* and under greenhouse conditions, to evaluate the pyraclostrobin different rates (0, 0.0375, 0.0750 and 0.150 mL L⁻¹) action, and one acibenzolar-S-methyl (ASM) rate (0.025 g L⁻¹), sprayed in three age (5 days before; 5 days before and 5 days after; and 5 days after the inoculation), to common bacterial blight in snap bean leaves, cultivar Bragança, and this products effect in the polyphenoloxidase, Peroxidase and total soluble protein production in non inoculate and inoculate leaves. Pyraclostrobin did not inhibit *in vitro* *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* growth. In greenhouse, pyraclostrobin concentrations with acibenzolar-S-methyl reduced the area under the disease progress curve (AUPDC) in treated plants and, for products application time the lowest value of AUPDC occurred five days before and five days after products sprinkling. Higher polyphenoloxidase, peroxidase and total soluble protein contents were observed in plant leaflets sprinkled with pyraclostrobin and ASM which are probably related to resistance induction in snap bean plants.

Additional keywords: *Phaseolus vulgaris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, acquired systemic resistance, benzothiadiazole, strobilurin.

INTRODUÇÃO

Bacterioses de plantas cultivadas no Brasil vêm assumindo importância crescente, provocando elevadas perdas na produção, embora não existam estatísticas precisas (Romeiro, 1995; Lopes & Quezado-Soares, 1997). O cretamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, apresenta grande importância na cultura do feijoeiro, devido à sua distribuição em quase todas as regiões produtoras do país. Os sintomas ocorrem em toda a parte aérea da planta, afetando folhas, caules, vagens e sementes (Bianchini et al., 2005).

A indução de resistência vem sendo alvo de estudos para o controle de patógenos bacterianos, já que o controle químico é ainda considerado variável. Esta envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes bióticos, como microrganismos viáveis ou inativados (Stangarlin & Pascholati, 1994) ou abióticos, como ácido aminobutírico, ácido 2,6-dicloroisonicotínico e benzotiadiazólicos (Görlach et al., 1996; Halfeld-Vieira et al., 2006).

A resistência de plantas a patógenos pode e têm sido conseguida pela aplicação de produtos químicos sintéticos em plantas. Após o desenvolvimento do acibenzolar-S-metil, observou-se um considerável avanço na indução de resistência. Desde então, vários produtos tem surgido, explorando a capacidade de ativação de diferentes mecanismos de defesa nas plantas, como quitosanas, probenazole, Oxycor[®], harpina, entre outros (Sobrinho et al., 2005).

Os fungicidas do grupo das estrobilurinas compreendem uma variedade de compostos sintéticos protetores de plantas com amplo espectro na ação antifúngica. Estudos realizados têm demonstrado evidências da influencia direta de estrobilurinas na fisiologia de plantas (Köehle et al., 2002). Estes efeitos fisiológicos têm indicado que a piraclostrobina pode também, aumentar a habilidade de algumas plantas na resistência contra o ataque de fitopatógenos (Venancio et al., 2003).

Diante do exposto esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de piraclostrobina em comparação com acibenzolar-S-metil na indução da resistência de feijão vagem ao cretamento bacteriano e análises bioquímicas de enzimas/proteínas (peroxidase, polifenoloxidase, proteínas totais e fenóis) envolvidas na indução da resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Atividade antimicrobiana de piraclostrobina *in vitro*

Visando verificar a ação *in vitro* de piraclostrobina (Comet[®]), sobre a bactéria, o isolado de Xap UFV 50 foi cultivado em 50 mL de nutriente líquido, durante 48 h, a 28 °C. Seguida a incubação, o isolado foi transferido para recipiente contendo meio de cultura NSA

(nutriente-sacarose-ágar) fundente, a 45 – 50 °C, na proporção de 1 parte de suspensão bacteriana para 9 partes de meio de cultura. Essa mistura foi transferida para placas de Petri (20 mL), deixando-a solidificar sob condições ambientes. Após a solidificação foram realizados perfurações (pocinhos) de 5 mm de diâmetro no meio de cultura e acrescentado 40 µL do produto nas concentrações de 0, 0,0075, 0,0375 e 0,150 mL.L⁻¹. As placas foram incubadas a 28 °C, durante 48 h e, em seguida, avaliado o diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos “pocinhos”. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

Indução de resistência em feijão vagem ao crestamento bacteriano comum

Sementes de feijão vagem foram semeadas em vasos de 3 litros de capacidade contendo substrato autoclavado constituído de um terço de areia grossa, um terço de solo e um terço de esterco de curral curtido, acrescido de calcário dolomítico e adubo químico conforme a análise de solo (Trani & Passos, 1997), sob condições de casa de vegetação. Foram semeadas cinco sementes de feijão vagem cultivar Bragança por vaso e, após a germinação, selecionou-se as plantas com desenvolvimento normal, deixando três plantas por vaso. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com cinco repetições esquema fatorial 5 x 3 para as tinturas etanólicas e 4 x 2 para os óleos essenciais.

Piraclostrobina foi pulverizada nas folhas das plantas, com 10 dias após a emergência, nas concentrações de 0, 0,0375, 0,0750 e 0,150 mL.L⁻¹. Neste ensaio utilizou-se acibenzolar-S-metil (Bion[®]) (0,025 g L⁻¹) como parâmetro de indução de resistência já conhecido (Romeiro et al. 1999). Para tal, foi utilizado um pulverizador manual com 1,5 litros de capacidade e bico de pulverização do tipo leque.

Os períodos de aplicação foram: pulverização cinco dias antes da inoculação, cinco dias antes e cinco dias após a inoculação e cinco dias após a inoculação. Foi realizada a inoculação nas folhas primárias das plantas, aos 15 dias após a emergência, através do método de agulhas múltiplas (Andrus, 1948), com o isolado UFV 50, na concentração de 10⁸ ufc mL⁻¹.

A avaliação da severidade de sintomas da doença nos folíolos foi realizada aos 12, 15 e 18 dias após a inoculação, através da escala de notas de 1 a 5, conforme Maringoni et al. (1993): 1 – sem sintoma, 2 – até 25% de amarelecimento e/ou necrose na área inoculada, 3 – 26 a 50% de amarelecimento e/ou necrose na área inoculada, 4 – 51 a 75% de amarelecimento e/ou necrose na área inoculada, 5 – acima de 75% de amarelecimento e/ou necrose na área inoculada. Com os resultados obtidos nas avaliações foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), conforme (Schneider et al., 1976), e os valores foram submetidos à análise de variância fatorial e a testes de separação de médias com o emprego do programa estatístico ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2006).

Análises bioquímicas

Para as análises de peroxidase, polifenoloxidase e teor de proteínas foi instalado ensaio em casa de vegetação com vasos, conforme descrito no item anterior.

Foram retiradas uma folha primária de cada repetição de plantas não inoculadas e inoculadas (5 dias após os tratamentos), sendo no total 5, coletadas em cinco épocas (concomitantemente, 3, 5, 8 e 10 dias após o tratamento). Para tanto foi pulverizado nas folhas piraclostrobina na concentração de 0,0750 mL.L⁻¹, o acibenzolar-S-metil na concentração de 0,025 g L⁻¹ e a testemunha.

As amostras após pesagem, foram embaladas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a temperatura de – 20 °C. Foram processadas para as análises, através da trituração em 5 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7 à temperatura entre 0 e 4 °C e centrifugação do homogeneizado obtido, por 15 min a 10000 g (peroxidase (POD) e proteínas solúveis totais). Para a atividade de polifenoloxidase (PFO) foi utilizado tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 na trituração. O sobrenadante foi armazenado em frascos de vidro, mantidos em freezer a – 20 °C, para ser utilizado como extrato nas análises.

O teor de PFO foi determinado de acordo com o método de Cano et al. (1997) modificado. A reação ocorrida, em banho-maria, entre 0,3 mL do extrato e 1,85 mL de solução de catecol (pyrocatecol 0,1 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0), durante 30 min, a 30 °C, foi interrompida após a adição de 0,8 mL de ácido perclórico a 5% (HClO₄). A leitura da

absorbância foi realizada em espectrofotômetro com leitura 395 nm. O teor de PFO foi obtido aplicando-se a fórmula abaixo, calculando-se em U.A. g^{-1} massa fresca min^{-1} .

$$\text{Fórmula: PFO} = [(L / T) \times 1000] / [(P \times \text{Am}) / \text{VT}]$$

Onde: PFO = atividade de polifenoloxidase

L = leitura do espectrofotômetro (Abs.)

T = tempo de reação (min)

1000 = unidade de enzima (fator)

P= peso da amostra (mg)

Am= alíquota do extrato (mL)

VT= volume de tampão para homogenização da amostra (mL)

O teor de POD foi determinado pela reação dos extratos com as soluções A (20 mM de H_2O_2 + tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7) e B (4mM de aminoantipirina em 10 mM de fenol) durante 5 min a 30 °C, parando-se a reação com 2 mL de álcool etílico absoluto, fazendo-se em seguida a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 505 nm (Lima, 1994). O teor de peroxidase foi calculado com o emprego da fórmula descrita abaixo, calculando-se em $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$ decomposto g^{-1} massa fresca min^{-1} .

$$\text{Fórmula: POD} = [(L \times \text{Vt}) / (6,58 \times T \times \text{Ve})] / [(P \times \text{Ve}) / \text{VT}]$$

Onde: POD = atividade da peroxidase

L = leitura do espectrofotômetro (Abs.)

Vt = volume total da amostra (mL)

T = tempo de reação (min.)

Ve = volume utilizado do extrato (mL)

P= peso da amostra (mg)

VT= volume de tampão para homogenização da amostra (mL)

O teor de proteínas totais solúveis foi determinado pelo método de Bradford (1976), através da reação entre uma alíquota do extrato vegetal e 5 mL do reativo de Bradford (100 mg de brilhante Blue G + 50 mL de etanol 95% + 100 mL H_3PO_4 85% + água destilada q. s. p. 1 L), durante 5 min, realizando-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores obtidos na leitura foram substituídos na equação da curva de eficiência (caseína como padrão) e expressos em mg proteína g^{-1} massa fresca.

$$\text{Equação da reta: } y = (0,0257 + 0,0041 x) / \text{Ve}$$

y = leitura do espectrofotômetro

x = teor de proteína

Ve = peso da massa fresca utilizada

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes *in vitro*, a piraclostrobina não inibiu o crescimento do isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Conforme Silva et al. (2007), em ensaios realizados *in vitro* com extrato aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* e de acibenzolar-S-metil (ASM), que constataram que estes produtos não promoveram inibição significativa do crescimento de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. Kessmann et al. (1994) afirmaram que ASM é definido como um indutor de SAR por não possuir atividade antimicrobiana direta.

Quanto às concentrações de piraclostrobina, juntamente com o acibenzolar-S-metil (ASM), utilizados no ensaio em casa de vegetação, com a finalidade de avaliar o controle do crescimento bacteriano comum, foi observada a redução da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) nas plantas tratadas com os produtos, conforme a Tabela 1. Com relação as três épocas de aplicação dos produtos, pode-se observar que o menor valor da AACPD ocorreu com duas aplicações desses, cinco dias antes e cinco dias após a inoculação (Tabela 1). Observou-se também que não houve diferença estatística nos valores de AACPD para as diferentes concentrações de piraclostrobina utilizadas. A dose de 0,0750 mL.L⁻¹ é registrada para a cultura visando o controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Agrofit, 2008).

A ação do ASM e piraclostrobina na redução dos sintomas da doença (Tabela 1) foi devido a ativadores fisiológicos de resistência, uma vez que não houve ação direta de piraclostrobina na inibição do crescimento bacteriano *in vitro* e o ASM não ocorreu devido a uma ação direta sobre a bactéria, uma vez que esses produtos não apresentaram atividade antibiótica *in vitro* e o ASM não apresenta atividades antimicrobianas diretas (Kessmann et al. 1994).

Alguns trabalhos avaliaram a ação de ASM e piraclostrobina na defesa de plantas contra bactérias. Hermes et al. (2002) demonstraram que pyraclostrobin aumentou a resistência de fumo contra a infecção causada pelo vírus do mosaico do fumo (TMV) e por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Houve acúmulo de ácido salicílico nos tecidos das plantas

tratadas e de PR-1 proteínas, indicando que pyraclostrobin age ativando mecanismos de defesas nas plantas, além da ação fungicida.

Soylu et al., (2003) demonstraram que o ASM reduziu a severidade de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, em 75%, aos 7 dias após a inoculação em plântulas de tomate, mantendo esse mesmo nível de controle até os 14 dias após a inoculação. Quando este mesmo indutor foi utilizado para o controle de *R. solanacearum* em tomate, reduziu a severidade da murcha bacteriana em 66% (Silva et al., 2007).

Estudando a ação do ASM na indução de resistência à canela-preta em batata, em diferentes cultivares, Benelli et al. (2004) verificaram que no tratamento utilizando 60 mg i.a. L⁻¹ houve diminuição da incidência de canela preta nas três cultivares avaliadas, comparando-as à testemunha. Já Kuhn (2007) observou em plantas de feijão, que o ASM reduziu os sintomas do crestamento bacteriano comum em torno de 79%. Porém, no patossistema feijoeiro/*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Soares & Maringoni (2002) não constataram proteção tanto no tratamento de sementes, quanto na aplicação foliar de ASM.

No ensaio envolvendo o teor de polifenoloxidase, as plantas tratadas com ASM e piraclostrobina apresentaram um pico de produção da enzima aos 5 dias após a aplicação dos produtos, mas piraclostrobina apresentou indução já a partir do terceiro dia após a aplicação e manteve-se superior a testemunha, até o décimo dia após a aplicação. A inoculação da bactéria, aos cinco dias após o tratamento com os produtos, não alterou a produção dessa enzima na planta, inclusive na testemunha pulverizada com água (Figura 1). Estando de acordo com Campos et al. (2004) que não observaram diferença na atividade de poliofenoloxidase, na cultivar de feijão AB 136 (resistente à antracnose), após a inoculação com o fungo desafiador *Colletotrichum lindemuthianum*.

Li & Steffens (2002), estudaram a importância da polifenoloxidase na resposta de defesa das plantas tomate transgênicas, que expressavam altos níveis dessa enzima. Após a inoculação das plantas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, elas apresentaram poucas lesões nas folhas em relação aos controles, aos sete dias da inoculação. A polifenoloxidase catalisa a oxidação de fenóis para quinonas, na presença de oxigênio. A expressão dessa enzima pode atuar como uma linha de defesa adicional na proteção de plantas a ataques de patógenos e insetos (Thipyapong et al., 1995).

Quanto à peroxidase (Figura 2) ocorreu um pico de produção para os tratamentos com ASM e piraclostrobina aos 8 e 5 dias após a aplicação, respectivamente. Sendo maior o teor dessa enzima para o tratamento com piraclostrobina. Não houve diferença pela inoculação da bactéria no quinto dia após o tratamento com os produtos ocorrendo apenas um ligeiro aumento nas plantas tratadas com ASM e inoculadas com a bactéria. Estes resultados podem ser vistos também para as proteínas solúveis totais, indicando atividades enzimáticas para as plantas tratadas com ASM e piraclostrobina, em relação à testemunha.

A peroxidase é uma importante enzima nas plantas e está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e outras (Kao, 2003).

Peroxidases e polifenoloxidasas lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos. Um dos resultados mais estudados deste fenômeno é o aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas (Bindschedler et al., 2002).

Cavalcanti et al. (2006) demonstrara a participação das peroxidases e oxidases de polifenóis na resistência induzida de tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*, após a pulverização das plantas com ASM ou Ecolife®. Sendo conferido o aumento na atividade destas enzimas logo nas primeiras horas após a pulverização, ocorrendo maior atividade no quinto dia após a inoculação do patógeno. Na avaliação da resistência à antracnose de quatro cultivares de feijão, pulverizadas com ácido salicílico ou com um fungo indutor, Campos et al. (2004) verificaram que, avaliando a atividade de peroxidase e polifenoloxidase das plantas tratadas, cinco dias após a inoculação com o patógeno, houve um acréscimo na atividade destas enzimas nos tratamentos com ácido salicílico em todas as cultivares.

Em trabalho realizado para investigar o modo de ação de ASM e extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na atividade protetora de plantas de tomate contra *Ralstonia solanacearum*, através de alterações na atividade de determinadas enzimas, observou-se que a atividade de peroxidase aumentou significativamente nas plantas não inoculadas com a bactéria e tratadas com ASM e extratos aquosos de micélio de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, no terceiro, sétimo e décimo segundo dias após o tratamento, em relação ao tratamento com água. A atividade de polifenoloxidase em plantas tratadas com os

indutores e inoculadas com a bactéria foi menor do que nas plantas tratadas com água e inoculadas com o patógeno (Silva et al., 2007).

Pereira et al. (2008) verificaram que, paralelamente à redução da severidade da murcha-de-verticílio, promovida por ASM e pelo filtrado de micélio de *Rhizopus* sp., houve aumento relativo das atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Onde as plantas apresentaram um pico de atividade de peroxidase aos oito dias após os tratamentos, enquanto que a atividade de polifenoloxidase apresentou pico já aos quatro dias após o tratamento com o produto. Este estudo pode indicar o potencial de algumas espécies de microrganismos para a síntese de produtos que possuam ação de indução de resistência em plantas, já que as estrubilurinas foram primeiro identificadas ocorrendo naturalmente nos basidiomicetos *Strobilurus tenacellus* e *Oudemansiella mucida* (Ypema & Gold, 1999).

Com relação ao teor de proteínas solúveis totais ocorreu um aumento já aos 3 dias após os tratamentos, com picos de produção aos 5 e 8 dias após os tratamentos, sendo que o fator inoculação aos cinco dias após os tratamentos com os produtos não acarretou maior produção de proteínas (Figura 3). Silva (2007), em bioensaio conduzido no patossistema berinjela/*Ralstonia* verificou aumento na quantidade de proteínas no tratamento com ASM e inoculadas do terceiro ao décimo segundo dias após o tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Disponível em:

http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: maio/ 2008.

ANDRUS, C.F. A method of testing beans for resistance to bacterial blights. **Phytopathology**, v. 38, p. 757-759, 1948.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C. & CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. . In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A & Camargo, L.E.A. (Ed.). Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. pp. 333-349.

BINDSCHEDLER, L.F.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53:1357-1376. 2002.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. 1976.

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

CANO, M.P.; ANCOS, B., MANTALLANA, M.C.; CÁMARA, M.; REGLERO, G. & TABEA, J. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 59: 411-419, 1997.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JUNIOR, P.M., COSTA, J.C.B. & SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira*, 31:372-380. 2006.

GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. & RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8:629-643. 1996.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; VIEIRA JÚNIOR, J.B.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A. & BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 1247-1252. 2006.

HERMS, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H.; CONRATH, U. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiology* 130: 120-127. 2002.

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 39: 83-89. 2003.

KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T. & HERZOG, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32:439-459.1994.

KÖEHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; STIERL, R.; GERHARD, M.; KAISER, W. GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K. & HERMS, S. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In:Lyr, H.; Russell, P.E.; Dehne, H-W. & Sisler, H.D. (eds), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. Andover, 2002.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. Tese de Doutorado. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo. 2007.

- LI, L. & STEFFENS, J.C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 25: 239-247. 2002.
- LIMA, G. P. P. Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas, peroxidase e nitrato redutase em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440). Tese de Doutorado. Botucatu SP. Universidade Estadual Paulista. 1994.
- LOPES, C.A. & QUEZADO-SOARES, A.M. Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1997.
- MARINGONI, A.C.; FREGONESE, C.H.; TOFOLI, J.G & KUROSZAWA, C. Reação foliar e de vagens de feijoeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. *Fitopatologia Brasileira* 18: 412-415. 1993.
- PEREIRA, R.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; AMARAL, D.R.; LUCAS, G.C. & CAVALCANTI, F.R. Ativação de defesa em cacauzeiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. *Pesquisa Agropecuária brasileira*, Brasília 43: 171-178. 2008.
- ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas. Viçosa MG. UFV. 1995.
- ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; JESUS JÚNIOR, W.C. & PEREIRA, J.L.A. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. *Fitopatologia Brasileira* 24 (supl.): 255, 1999.(Resumo)
- SCHNEIDER, R.W.; WILLIAMS, R.J. & SINCLAIR, J.B. Cercospora leaf sport of cowpea: models for estimating yield loss. *Phytopathology* 66:384-388. 1976.
- SILVA, R.F. Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*). Tese de Doutorado. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo. 2007.
- SILVA, F. de A. S. e & AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress on Computers in Agriculture, Orlando: Anais... Orlando: American Society of Agricultural Engineers, p.393-396, 2006.
- SILVA, R.F., PASCHOLATI, S.F. & BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira* 32:189-196. 2007.
- SOARES, R.M. & MARINGONI, A.C. Efeito de acibenzolar-S-metil sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-curtobacterium. *Summa Phytopathologica* 28: 41-45, 2002.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.O. & CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. & Romeiro, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ. 2005. pp. 51-80.

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

STANGARLIN, J.R. & PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phytopathologica* 20: 16-21.1994.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 40: 673-676. 1995.

TRANI, P.E.; PASSOS, F.A. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas: IAC. 1997.

VENANCIO, W.S.; RODRIGUES, M.A.T.; BEGLIOMINI, E. & SOUZA, N. L. de. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. *UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrônômicas e Engenharia* 9: 59-68. 2003.

YPEMA, H.L. & GOLD, R.E. Kresoxim-methyl modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83:4-19. 1999.

TABELA 1 – Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) do crestamento bacteriano comum em folhas de feijão vagem submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamentos	Épocas de aplicação			
	5 dias antes	5 dias antes + 5 dias após	5 dias após	Média
Água	29,73	29,28	29,25	29,42 a *
Pyraclostrobin 0,0375 mL.L ⁻¹	27,27	25,59	27,24	26,70 b
Pyraclostrobin 0,075 mL.L ⁻¹	26,55	26,91	27,66	27,04 b
Pyraclostrobin 0,150 mL.L ⁻¹	26,88	25,02	28,68	26,86 b
ASM 0,025 g L ⁻¹	26,76	26,94	27,18	26,96 b
Média	27,44 ab	26,75 b	28,00 a	

CV (%) 5,25

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

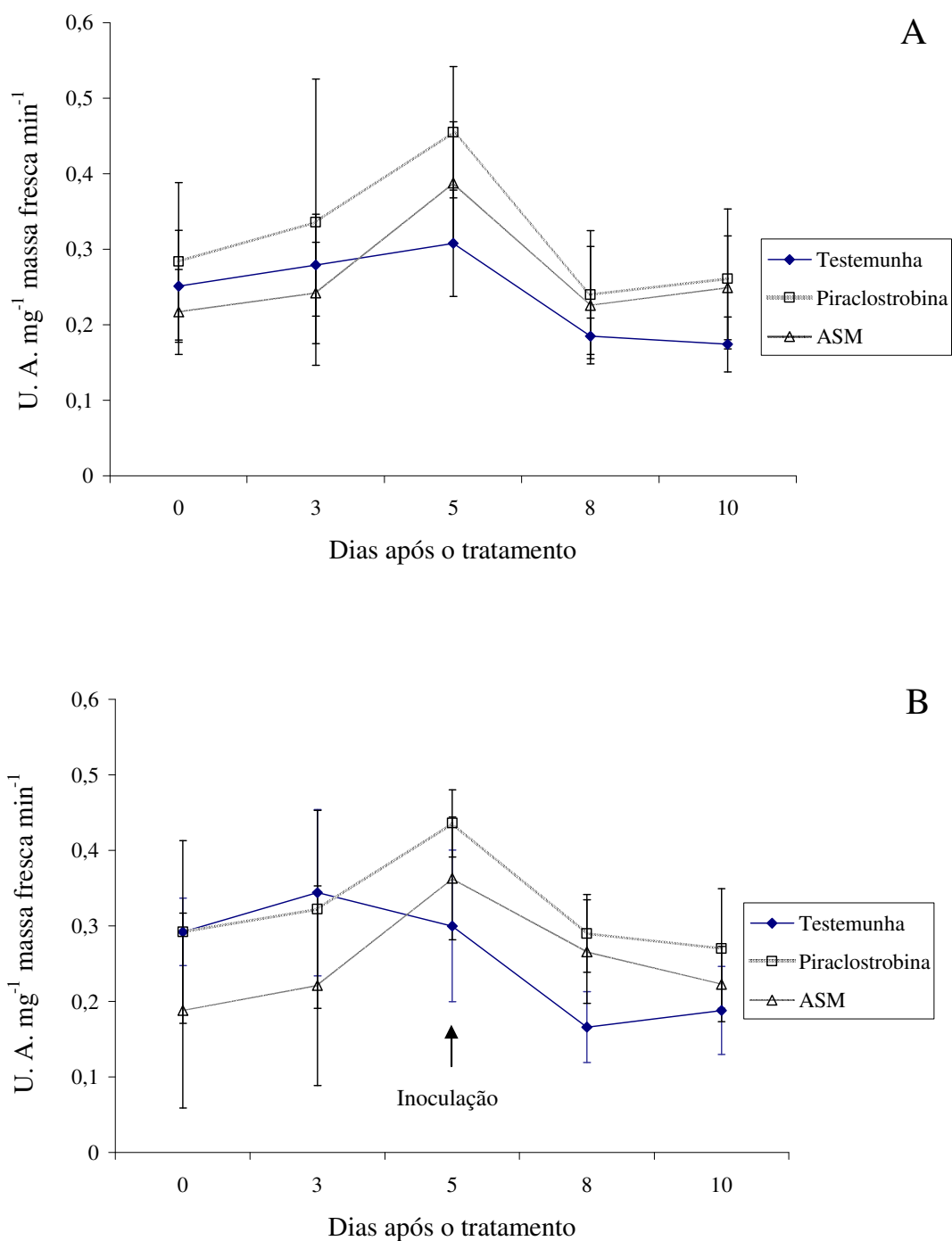


Figura 1 - Teor de polifenoloxidase do tecido foliar do feijoeiro em função do tratamento com piraclostrobina ($0,075 \text{ mL.L}^{-1}$) e acibenzolar-S-metil ($0,025 \text{ g L}^{-1}$) em plantas não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (concentração 10^8 ufc mL^{-1}). Barras indicam a média \pm o erro padrão.

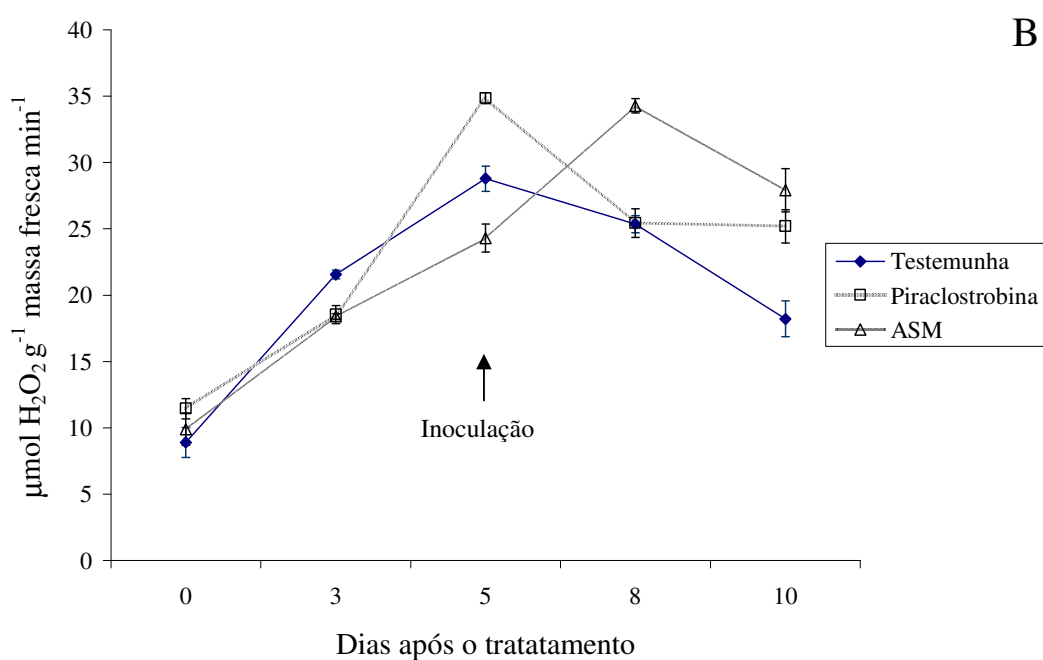
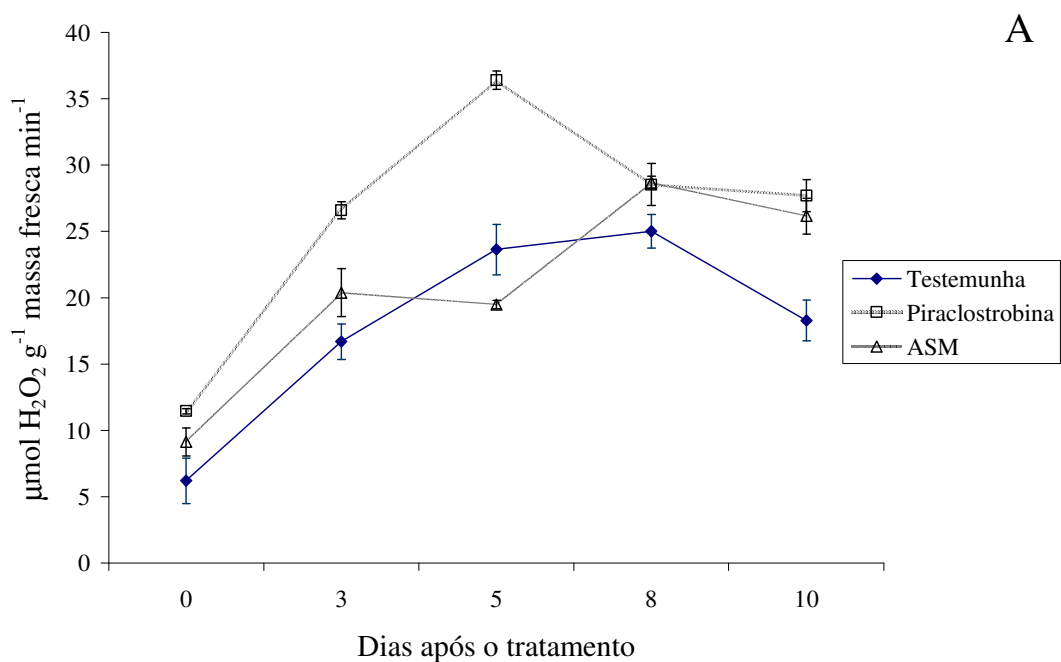


Figura 2 - Teor de peroxidase do tecido foliar do feijoeiro em função do tratamento com pyraclostrobina ($0,075 \text{ mL.L}^{-1}$) e acibenzolar-S-metil ($0,025 \text{ g L}^{-1}$) em plantas não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (concentração 10^8 ufc mL^{-1}). Barras indicam a média \pm o erro padrão.

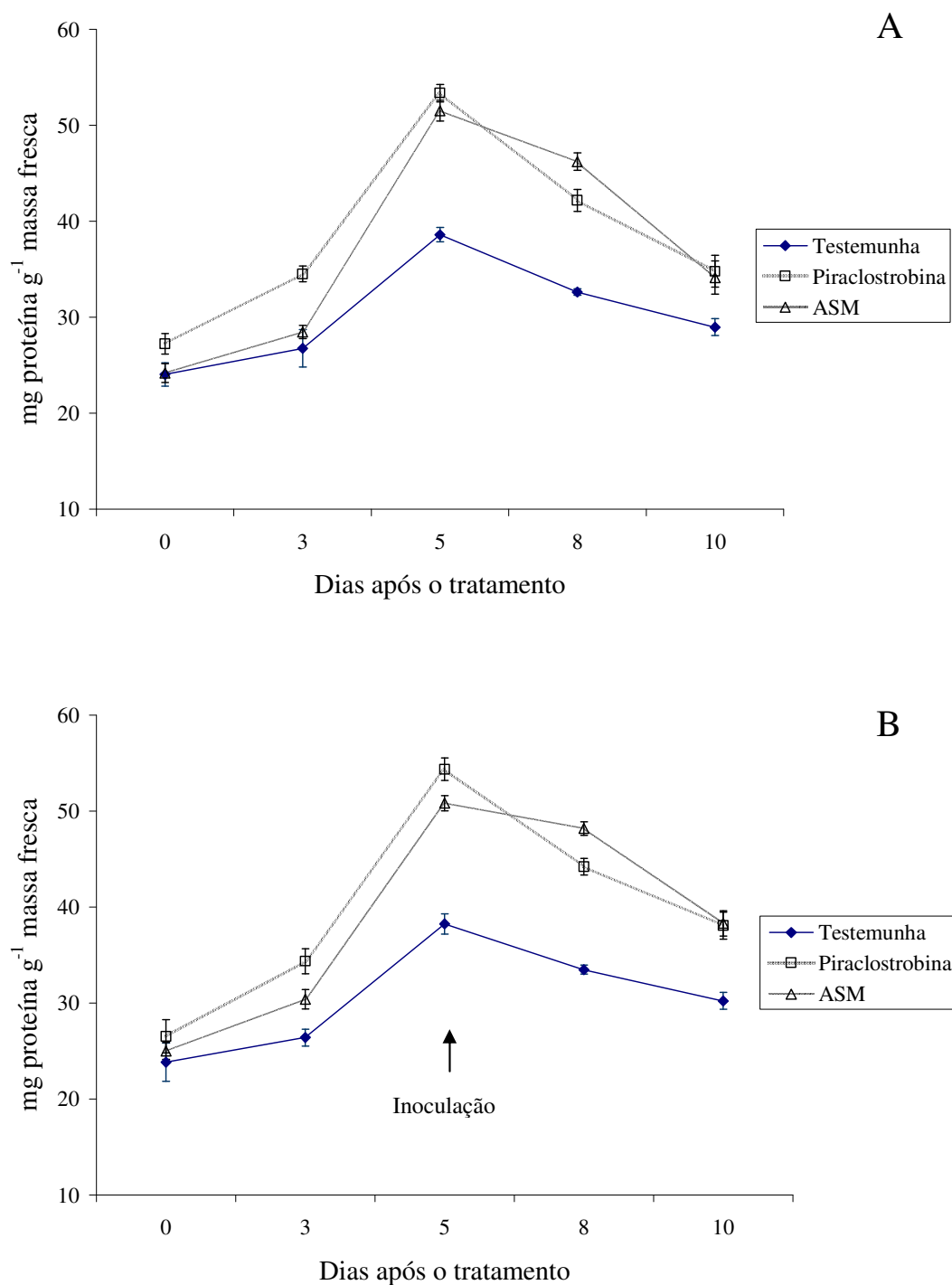


Figura 3 - Teor de proteínas solúveis totais do tecido foliar do feijoeiro em função do tratamento com pyraclostrobina ($0,075 \text{ mL.L}^{-1}$) e acibenzolar-S-methyl ($0,025 \text{ g L}^{-1}$) em plantas não inoculadas (A) e inoculadas (B) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (concentração 10^8 ufc mL^{-1}). Barras indicam a média \pm o erro padrão.

4. CONCLUSÕES

- Tinturas etanólicas apresentaram ação *in vitro* para doses elevadas de *L. alba* e *L. sidoides*, enquanto que os óleos essenciais apresentaram ação em baixas concentrações, a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*;
- Tintura etanólica de *L. alba*, acibenzolar-S-metil e piraclostrobina proporcionaram baixos valores da área abaixo da curva do progresso da doença (crestamento bacteriano comum), quando pulverizadas em plantas de feijão vagem cultivar Bragança, diferindo da testemunha;
- Tintura etanólicas de *L. alba*, *L. sidoides*, *M. glomerata*, *Equisetum* sp., *H. helix*, acibenzolar-S-metil e piraclostrobina propiciaram maiores níveis de polifenoxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais em plantas de feijão vagem, cultivar Bragança, o que sugere seu envolvimento nos mecanismos de indução de resistência ao crestamento bacteriano comum;
- Óleos essenciais de *R. officinalis* e *C. zeylanicum* não apresentaram ação sobre o crestamento bacteriano comum, em feijão vagem cultivar Bragança, e, nas doses utilizadas, não apresentaram envolvimento no mecanismo de indução de resistência a esta doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (coord). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafós, 786p. 1996.

ASTHANA, A.; DIXIT, K.; TRIPATHI, N. N.; DIXIT, S. N. Efficacy of *Ocimum* oil against fungi attacking chilli seed during storage. **Tropical Science**, v. 49, p. 15-20, 1989.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R. & MENTEN, J. O. M. **Dinâmica de fenilalanina amonia-liase e peroxidase em feijão-caupi tratado com acibenzolar-s-metil**. 2006. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa/anaisconac2006/resumos/fs14.pdf>. Acesso em maio/2008. np.

BALBI-PEÑA, M.I.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M. & STANGARLIN, J.R. Atividade de peroxidases em folhas de tomateiro tratadas com *Alternaria solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32 (supl.), p. 168, 2007.

BARROS, B.C.; OLIVEIRA, S.H.F.; LEITE, L.G.; ITO, M.F.; CAMPOS, T.B.; OLIVEIRA, C.M.G.; SANAZZARO, A.M.; CASTRO, J.L. & PINZAN, N.R. **Manejo integrado de pragas e doenças do feijoeiro**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2000. v. 3, 39 p. (Manual Técnico, Série Especial).

BAYSAL, Ö.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Berlin, v.52, n.6, p.747-753, 2003.

BECKER, A. **Controle alternativo de doenças do pepino produzido em cultivo orgânico e protegido**. 2003. 31 f. Trabalho de conclusão de curso (TCC), Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon. 2003.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C. & CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. . In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A & CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.

BLAZON, V. L. **Crestamento bacteriano comum do feijoeiro: Efeito da adubação nitrogenada e potássica e aspectos bioquímicos relacionados à doença**. 2003. 172 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu. 2003.

BINDSCHEDLER, L.F.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53:1357-1376. 2002.

BIRECKA, H.; BRIBER, K.A.; CATALFAMO, J.L. Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. *Plant Physiology*, v.52, p.43-49, 1973.

BISWAS, S.; DAS, N. K.; QADRI, S. M. H.; SARATCHNDRA, B. Evaluatng different plant extracts against three major diseases of mulberry. *Indian Phytopathology*, v. 48, p. 342-346, 1995.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMAN, D. J. & SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, p. 128 – 134, 2004.

BONALDO, S.M., PASCHOLATI, S.F. & ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. . In: CAVALCANTI, L.S., DI PIERO, R.M., CIA, P., PASCHOLATI, S.F., RESENDE, M.L.V. & ROMEIRO, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba. FEALQ. 2005. pp. 11-28.

BORÉM, A.& CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J. & BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa/MG: Editora UFV, 2006, p. 13-18.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.43, p.545-580, 2005.

BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.

CASTELLANE, P.D.; VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. **Feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.): cultivo e produção de sementes**. Jaboticabal: FUNEP/FCAV-UNESP, 1988, 60 p.

CATARINO, V.; GHINI, R.; BETTIOL, W.; SCRAMIN, S. & ZAVATTI, L. M. S. Efeito de extratos de *Vernonia condensata* e *Tagetes minuta* sobre a germinação de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*. In: Workshop sobre produtos naturais no controle de pragas, doenças e plantas daninhas, Jaguariúna. **Anais...** Jaguariúna: Embrapa – CNPDA, p. 31. 1990.

CAVALCANTI, L.S., BRUNELLI, K.R. & STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S., DI PIERO, R.M., CIA, P., PASCHOLATI, S.F., RESENDE, M.L.V. & ROMEIRO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba. FEALQ. 2005. pp. 81-124.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* sp. **Phytopathology**, Lancaster, v.84, p. 236-242, 1994.

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

CORREA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA R. e QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais do Cultivo à Terapêutica**. Editora Vozes,1998.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais-Do cultivo à terapêutica**. Petrópolis: Vozes, p. 139-140, 1999.

CORRÊA JÚNIOR, C; MING, L. C. e SCHEFFER M. C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. FUNEP. Jaboticabal. 1994.

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R.C. & BRAZ-FILHO, R. Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 6, p. 792-795, 2001.

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; ASSUNÇÃO, J.C.C. & BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 66-67, 2002.

DHINGRA, O.D.; COSTA, M.L.N.; SILVA JUNIOR, G.J. & MIZUBUTI, E.S.G. Essential oil of mustard to control *Rhizoctona solani* seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 683-686, 2004.

DINIZ, S. P. S. S.; UTUM, H.; KANZAKI, L. I. B. & QUEIROZ, M. C. Controle biológico de *Myrthecium verrucaria* por óleos vegetais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25 (supl.), p. 369, 2000.

DOURADO NETO, D. & FANCELLI, A. L. **Produção de feijão**. Guaíba: Agropecuária, 2000.

DUARTE M. T. **Divisão de Microbiologia do CPQBA**. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2002. Acesso em novembro/2002. np.

DURRANT, W. E. & DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185 – 209, 2004.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de Olericultura**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1981. v. 1, 36 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000, 402 p..

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000.

FRENCH, R. C.; LONG, R. K.; LATTERELL, F. M.; GRAHAM, C. L.; SMOOT, J. J.; SHAW, D. E. Effect of nonanal, citral, and citrus oils on germination of conidia of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Phytopathology**, v. 68, p. 877-882, 1978.

FREY, S. & CARVER, T.L.W. Induction of systemic resistance in pea powdery mildew by exogenous application of salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, p. 239-245, 1998.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; GUT RELLA, M.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J.-P.; KESSMAN, H.; RYALS, J., A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v.10, n.1, p.61-70, 1996.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases**: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève, 1982. 324p.

GEOPLANT. **Grupo de Estudos e Pesquisas de Plantas Aromáticas, Medicinas e Tóxicas – Faculdade de Farmácia/UFMG**. Disponível em: <http://www.manuelzao.ufmg.br/jornal/jorn-ulted-9/ed9-raizes.htm>. Acesso em novembro/2002. np.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.205-227, 2005.

GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. & RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.629-643, 1996.

GRÜNER, R.; STROMPENT G.; PFITZNER, A.P.; PFITZNER, U.M. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.270, p.4876-4886, 2003.

GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de café contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.89-94, 2001.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em café contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura). Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2004.

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

HAMMOND-KOSACK, K. E. & JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1773 – 1791, 1996.

HARTLEB, H.; HEITFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi**. Stuttgart: G. Fischer, 1997.

HEIL, M. & BOSTOCK, M.R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, London, v.89, p.503-512, 2002.

HERMS, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H.; CONRATH, U. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. **Plant Physiology**, v.130, p.120-127, 2002.

HERTWIG, I. F. G. **Plantas Aromáticas e Medicinais**. São Paulo: Editora Ícone. 1986.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y. & MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.151, n.3, p.171-180, 2003.

JALALI, B.L.; BHARGAVA S.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, p.65-74, 2006.

JAYAPRAKASHA, G.K.; JAGANMOHAN RAO, L. & SAKARIAH, K.K. Chemical composition of the volatile oil from the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p. 331-333, 1997.

JAYAPRAKASHA, G.K.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; ONO, H.; YOSHIDA, M. & JAGANMOHAN RAO, L. Phenolic constituents in the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and their antioxidant activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 1672-1679, 2006.

JOHAL, C. S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, S. P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal Botany**, v. 73 (Supl.1), p. S468-S474, 1995.

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

KAMATH, J.V.; RANA, A.C. & CHOWDHURY, A.R. Pro-healing effect of *Cinnamomum zeylanicum* bark. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 970-972, 2003.

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.

KAWANO, T. & MUTO, S. Mechanism of Peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 685-693, 2000.

KÖEHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; STIERL, R.; GERHARD, M.; KAISER, W. GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K. & HERMS, S. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: Lyr, H.; Russell, P.E.; Dehne, H-W. & Sisler, H.D. (eds), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. Andover, 2002.

KRISTENSEN, B.K.; BLOCH, H. & RASMUSSEN, S.K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

KUC, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. **Crop Protection**, San Diego, v. 19, p. 859 – 861, 2000.

KUHN, O. J. **Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***. 2003. 42 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon. 2003.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007, 140 p. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LAWTON, K.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v.10, p.71-82, 1996.

LEAL, L.K.A.M.; OLIVEIRA, V.M.; ARARUNA, S.M.; MIRANDA, M.C.C. & OLIVEIRA, F.M.A. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 09-11, 2003.

LÉON, J.; LAWTON, M.A. & RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1673-1678, 1995.

LETESSIER, M. P.; SVOBODA, K. P. & WALTERS, D. R. Antifungal activity of the essential oil of hyssop (*Hyssopus officinallis*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 673 – 678, 2001.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, v. 85, p. 1064-1068, 1995.

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

LOLLATO, M. A. Manejo de campos de feijão em plantio direto. In: DIA DE CAMPO DE FEIJÃO, 17/18, 2001/2002, Capão Bonito. **Anais...** Campinas: Instituto Agronômico, p. 43-49, 2002.

LORENZI, H. & SOUZA, H. M. de. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 3. ed. 2001.

MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A. & QUESSADA, M.P. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. In: GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, T. (Ed.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva, University of Geneva, 1986. p.267-286.

MADI, L. & KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 163-175, 1998.

MARINGONI, A.C. Controle das principais doenças bacterianas e fúngicas do feijoeiro. In: DIA DE CAMPO DE FEIJÃO, 17/18, 2001/2002, Capão Bonito. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, p. 51-59, 2002.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. & DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV. 2000.

MAZARO, S.M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007, 105 p. Tese (Doutorado na área de Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MING, L. C. Coleta de Plantas Medicinais. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência** - Um guia de estudos multidisciplinares. São Paulo. Ed. Universidade Paulista. p.69-86, 1996.

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

MOSCH, J.; ZELLER, W., RIECH, M. & ULBRICH, W. Further studies on plant extracts with a resistance induction effect against *Erwinia amylovora*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 411, p. 361-366, 1996.

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

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

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N. & PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimento. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PEREIRA, R.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; AMARAL, D.R.; LUCAS, G.C. & CAVALCANTI, F.R. Ativação de defesa em cacauzeiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.2, p.171-178, 2008.

PRETORIUS, J. C.; MAGAMA, S. & ZIETSMAN, P. C. Growth inhibition of plant pathogenic bacteria and fungi by extracts from selected South African plant species. **South African Journal of Botany**. South African, v. 69, n. 2, p. 186 – 192, 2003.

RAINA, V.K.; SRIVASTAVA, S.K.; AGGARWAL, L.K.K.; RAMESH, S. & KUMAR, S. Essential oil composition of *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, p. 374–376, 2001.

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**, v. 28, n. 2, p.123-130. 2003.

ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas. Viçosa MG. UFV. 2005.

ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; JESUS JÚNIOR, W.C. & PEREIRA, J.L.A. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. **Fitopatologia Brasileira**, v.24 (supl.), p. 255, 1999.(Resumo)

ROSALEN, P. L. **Faculdade de Odontologia (FOP) da Unicamp**. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2002. Acesso em novembro/2002. np.

ROSALEN, P. L.; CURY, J.; KOO, H. **Estudo da Unicamp comprova propriedade de cura do guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*)**. Faculdade de Odontologia (FOP) da Unicamp. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp>. Acesso em janeiro/2004. np.

SANTOS, M. M. F. B. **Efeito de metabólitos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), isolado *Citrus* sp.** 1996. 105 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

SANTOS, J.B. & GAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J. & BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa/MG: Editora UFV, 2006, p. 41-65.

SARTORATO, A. **Principais doenças do feijoeiro comum**. Disponível em: http://www.agromil.com.br/doi_feij.html>. Acesso em abril/2008. np.

SBALCHEIRO, C.C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.)**. 2006, 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; BONALDO, S.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* no crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologyca**, Botucatu, v. 21, p. 101, 1998. (Resumo)

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28 (supl.), p. 554 – 556, 2003.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*)**. 2007, 109 f. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SILVA, I. & SANT'ANA, D.M.G.. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Assoeste. 1995.

SILVA JÚNIOR, A. A. & VIZZOTTO, V.J.. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 9, n. 1, p. 5-8, 1996.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E. & STHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 3º ed. Porto Alegre: Editora Universidade UFRGS. 1995.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.O. & CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S., DI PIERO, R.M., CIA, P., PASCHOLATI, S.F., RESENDE, M.L.V. & ROMEIRO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba SP. FEALQ. 2005. pp. 51-80.

SOUSA, E.M.B.D.; CHIAVONE-FILHO, O.; MORENO, M.T.; SILVA, D.N.; MARQUES, M.O.M. & MEIRELES, M.A.A. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. using pressurized carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, n. 02, p. 229 - 241, 2002.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 11, p. 16-21, 1999.

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

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

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium – compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium. 1997.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 105-117, 2004.

VALARINI, P. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; MELO, I. S. Potencial da erva medicinal (*Cymbopogon citratus*) no controle de fitopatógenos do feijoeiro. **Revista de Agricultura**, v. 69, p. 139-150, 1994.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critic. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VAUGHN, K.C.; LAX, A.R. & DUKE, S.O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Sant Paul, v. 72, p. 659-665, 1988.

VÉRAS, S. M. & YUYAMA, K. Atividade antagônica *in vitro* do óleo essencial e extrato de pimenta longa (*Piper aduncum*) no crescimento de *Ralstonia solanacearum* raças 1 e 2. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26 (supl.), p. 274, 2001.

WHITAKER, J.R. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O. R. (Ed.) **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York : Marcel Dekker Inc., 1994. p. 543-556.

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Polyphenol Oxidases. In ROBISON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.) **Oxidative Enzymes in Foods**. 1991. p. 217- 273.