

Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto

Leonardo Pires Boava¹, Odair José Kuhn², Sérgio Florentino Pascholati^{3*}, Robson Marcelo Di Piero⁴ & Edson Luiz Furtado^{1*}

¹Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, CEP 18603-970, CP 237, Botucatu, SP; ²Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000 Itaqui, RS; ³Setor de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP; ⁴Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC. *Bolsistas CNPq.

Autor para correspondência: Edson Luiz Furtado (elfurtado@fca.unesp.br)

Data de chegada: 10/10/2008. Aceito para publicação em: 01/06/2009.

1622

RESUMO

Boava, L.P.; Kuhn, O.J.; Pascholati, S.F.; Di Piero R.M.; Furtado, E.L.. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.168-172, 2010.

Verificou-se o efeito de indutores de resistência bióticos e abióticos nas atividades de quitinase e peroxidase e na redução da severidade da ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii*. Para isso, mudas de dois clones de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) denominados VR e C0, com sessenta dias de idade, mantidas em casa de vegetação, receberam tratamentos com Bion® (Acibenzolar-S-metil-ASM), Agro-Mos®, Dipel®, Ecolife⁴⁰⁰ e uma preparação obtida a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, 5 dias antes da inoculação com o patógeno. Uma suspensão de uredósporos de *P. psidii*, coletados a partir de plantas

naturalmente infectadas, foi calibrada para 5 x 10⁴ uredósporos/ mL. A inoculação foi realizada na face abaxial das folhas e a avaliação se deu 15 dias após, estimando-se a severidade da doença por meio de escala de notas. Os tratamentos ASM, preparado de *S. cerevisiae* e Ecolife® apresentaram os melhores resultados de controle da doença e os demais tratamentos não se mostraram eficazes para o controle. O aumento de atividade das enzimas quitinase e peroxidase foi observado em ambos os clones, previamente tratados com os indutores(ASM e *S. cerevisiae*), 48 horas após a inoculação com o fungo.

Palavras-chave adicionais: *Eucalyptus*, Ferrugem das Mirtáceas, Proteínas-RP, Indução de resistência.

ABSTRACT

Boava, L.P.; Kuhn, O.J.; Pascholati, S.F.; Di Piero R.M.; Furtado, E.L.. Effect of biotic and abiotic inducers on the activities of chitinase and peroxidase and rust control caused by *Puccinia psidii* on *Eucalyptus*. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.168-172, 2010.

This study was aimed at verifying the effect of biotic and abiotic resistance inducers on the activities of chitinase and peroxidase as well as on the reduction of rust caused by *Puccinia psidii* in eucalyptus. Thus, seedlings of two 60-day eucalyptus clones were kept in a greenhouse and treated with Bion® (Acibenzolar-S-methyl, ASM), Agro-Mos®, *Saccharomyces cerevisiae*, Dipel®, Ecolife⁴⁰⁰, and Crop-set®, at 5 days before the pathogen inoculation. A suspension of *P. psidii* uredospores, collected from naturally infected plants, was adjusted to 5 x 10⁴

uredospores/mL. Inoculation was carried out onto the dorsal leaf surface and 15 days later the disease severity was assessed according to a grading scale. ASM, *S. cerevisiae* and Ecolife treatments presented the best results for disease control, and the remaining treatments were not effective. Chitinase and peroxidase activity assay only included the two first treatments (ASM and *S. cerevisiae*). The increase in the activity of these enzymes was observed at 48 hours after the fungus inoculation in both clones previously treated with inducers.

Keywords: resistance induced, diseases, Myrtaceous rust, PR Proteins.

O eucalipto tem se mostrado suscetível à uma série de doenças, na sua maioria, provocada por fungos patogênicos desde a fase de viveiro até os plantios adultos. Levantamentos efetuados em plantios seminais de *E. grandis* nas regiões do Vale do Paraíba e sul do Estado de São Paulo revelaram que 35% das árvores apresentavam ferrugem (*P. psidii*) aos 6 meses de idade. As plantas altamente infectadas tiveram reduções de 25 a 35% em altura e diâmetro quando comparada com as sadias (12).

O agente causal da ferrugem do eucalipto é o fungo *Puccinia psidii* Winter que apresenta uma ampla distribuição geográfica. Em algumas regiões do Brasil, a doença constitui um sério problema, principalmente devido à ocorrência de condições ambientais favoráveis praticamente durante todo o ano. Desde 1973, perdas econômicas preocupantes de

até 100% tem sido registradas sobre espécies do gênero *Eucalyptus* (1). O controle da ferrugem em condições de campo, envolvem o uso de resistência genética, estratégias de evasão, o controle químico e a utilização da resistência induzida.

A resistência induzida em plantas, também conhecida como indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida, envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (5).

Os agentes indutores de origem biótica ou abiótica capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas são chamados de eliciadores, podendo apresentar natureza química variada como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra a não existência de característica estrutural única na

determinação da atividade eliciadora (10). Após o reconhecimento, uma cascata de sinais é acionada, o que leva a ativação dos mecanismos de defesa das plantas.

A indução de resistência ocorre pela ativação de genes que codificam uma série de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina. A detecção e quantificação da expressão dessas enzimas seria uma das formas de separar o efeito indutor de resistência do efeito tóxico direto de determinado produto (25). As proteínas-RP englobam famílias de proteínas com características variadas (quitinases, α -1,3-glucanases, lisozimas, peroxidases, osmotinas, dentre outras), mas com o fato em comum de estarem todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese, apresentando dessa forma, potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção em plantas (13).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial de indutores bióticos e abióticos na redução da severidade da ferrugem do eucalipto e elucidar os mecanismos de ação envolvidos, com base na atividade de quitinase e peroxidase.

Foram utilizadas mudas clonais de eucalipto híbrido das espécies *E. grandis* x *E. urophylla*, denominados 'Urograndis', cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel. Foram utilizados dois clones de reação resistência/suscetibilidade conhecida. Um clone resistente à ferrugem denominado C0 e um clone classificado como suscetível denominado VR. As mudas foram mantidas em vasos em casa de vegetação climatizada no setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP-Botucatu.

Utilizou-se como indutores cinco produtos disponíveis comercialmente: I) Bion, um produto à base de acibenzolar-S-metil (ASM), que consiste em um composto sintético derivado do benzotiadiazol, que é um análogo funcional do ácido salicílico, na dose de 50 mg/L; II) O produto Agro-Mos®, um mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede da levedura *S. cerevisiae* (Hansen), obtido da Improcrop Brasil, na dose 1,5 L/ha; III) Ecolife 40 (Quinabra S.A.), um biofertilizante constituído por ácidos ascórbico, cítrico e láctico, flavonóides e fitoalexinas cítricas, na dose 0,6 L/ha; IV) Crop-set, um fertilizante foliar a base de citocininas, manganês, ferro e cobre, também obtido da Improcrop Brasil, na dose 0,6 L / ha; e V) Dipel®, uma formulação da bactéria *Bacillus thuringiensis* produzida pela empresa Abbott S/A, com o mínimo de 27,5 bilhões de bastonetes/ml de suspensão, na dose 20 mg/mL. Também foi utilizada uma preparação da levedura *S. cerevisiae* obtida a partir do fermento biológico Fleischmann®. Para isso, 200 mg/L do fermento foram submetidos a quatro autoclavagens de uma hora cada a 121 °C a 1 atm e entre os intervalos de autoclavagem, a suspensão foi retirada e resfriada em gelo por 20 minutos. Após as quatro autoclavagens, a suspensão ficou em descanso por 2 horas para decantação, onde foi utilizado o sobrenadante, na dose equivalente a 200 mg/L de fermento autoclavado.

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, onde cada planta representou uma repetição. Foram utilizadas plantas do clone VR (suscetível a ferrugem) com 2 meses de idade. Cada planta foi pulverizada com 15 mL de calda. Cinco dias após os tratamentos com os indutores, as plantas foram inoculadas com uredósporos de *P. psidii* obtidos de plantas de eucalipto infectadas naturalmente no campo. A partir dessa coleta foi preparada uma suspensão com 5×10^4 esporos/ mL, em água destilada contendo 2 gotas de Tween 80 (0,05%). O método de inoculação consistiu na aplicação da suspensão na face abaxial das folhas com o auxílio de uma bomba de vácuo. Em seguida as plantas foram mantidas em câmara de

crescimento regulada para 21 °C, fotoperíodo (tipo luz do dia) de 12 horas e com alta umidade relativa. A avaliação da doença foi realizada 15 dias após a inoculação, estimando-se por meio de uma escala de notas, o tipo de reação à infecção, proposta por Aparecido et al. (1), onde: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade; S1 = poucas pústulas sem esporulação; S2 = muitas pústulas, com esporulação; e S3 = muitas pústulas com grande esporulação.

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica no setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições onde cada planta representou uma repetição. O experimento foi representado por plantas do clone VR (suscetível à ferrugem) disposto em esquema fatorial 2 x 3 considerando plantas inoculadas e não inoculadas com *P. psidii* e plantas pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM), com *S. cerevisiae* (S.c) 5 dias antes da inoculação e plantas que não foram tratadas com indutores de resistência. Além de plantas do clone C0 inoculadas e não inoculadas que foram utilizadas com padrão de resistência à ferrugem.

As amostras foram representadas por folhas em desenvolvimento (1º e 2º pares). As coletas se deram 48 horas após a inoculação e as amostras foram mantidas em freezer à -18 °C para posterior obtenção do extrato protéico. Sub-amostras de 0,5 g de folhas correspondendo a cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e em seguida homogeneizadas em 4 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo 2,56 g de polivinilpirrolidona (PVP) e phenylmethanesulfonyl fluoride 5mM (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 20.000 g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga e armazenado à -20 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para se avaliar as atividades de quitinase e peroxidase.

A atividade enzimática de quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de "CM-chitin-RBV", a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV 4 mg mL⁻¹, Loewe Biochemica GmbH) (27). Para tanto, 200 mL do extrato protéico foi misturado com 600 mL do tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 (tampão de extração) e 200 mL de "CM-chitin-RBV" (2,0 mg mL⁻¹). Após 20 minutos a 40 °C, a reação foi paralisada com a adição de 200 mL de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g / 5 minutos. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 mL de tampão de extração + 200 mL de "CM-chitin-RBV"). A concentração de proteínas expressa em termos de equivalentes mg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (mg proteína mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 mg mL⁻¹, pelo método de Bradford.

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (20). A mistura da reação continha 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 mL de guaiacol e 306 mL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 250 mL de guaiacol e 306 mL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹). A concentração de proteínas foi

realizada pelo mesmo método descrito anteriormente.

Os tratamentos que obtiveram melhores resultados, quanto a severidade de ferrugem e classificados quanto ao tipo de infecção S0 (ausência de pústulas), foram: acibenzolar-S-metil (ASM), preparado de *S. cerevisiae* (S.c) e Ecolife 40[®] (Tabela 1). As plantas que receberam o tratamento Dipel[®], produto a base de *Bacillus thuringiensis*, apresentaram classificação S1. Os tratamentos com Agro-Mos[®] e Crop-set[®] não foram eficazes para o controle da ferrugem de modo que foram classificados como S2 (muitas pústulas, com esporulação) (Tabela 1). Para a continuidade dos estudos foram selecionados apenas o ASM e o preparado de *S. cerevisiae* (S.c).

Tanto o clone VR como o clone C0 inoculados, que não foram previamente tratados com ASM ou *S. cerevisiae* (S.c) apresentaram aumento de atividade da enzima quitinase quando comparados com as respectivas testemunhas sem a presença do patógeno (Figura 01).

O composto sintético ASM e o produto da autoclavagem da levedura *S. cerevisiae*, quando aplicados nas plantas de eucalipto do clone VR, cinco dias antes da inoculação com *P. psidii*, contribuíram para um aumento significativo na atividade de quitinase, tanto nas plantas que não foram inoculadas como nas plantas inoculadas, quando comparadas com as plantas testemunhas que não receberam tratamentos ou inóculo. Resultados semelhantes foram apresentados por Sobrinho (11) no patossistema caupi-*Macrophomina phaseolina* onde a atividade da enzima quitinase mostrou-se efetivamente aumentada nos tratamentos com ASM em associação com o patógeno ou isoladamente.

Estudos recentes têm mostrado que a super expressão de genes de quitinases em plantas, tem aumentado a resistência dessas plantas a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, componentes principais das paredes celular dos fungos, podendo apresentar atividade antimicrobiana (13).

O aumento da atividade da enzima pode estar ligado à capacidade do ASM e da levedura em ativar mecanismo de defesa da planta como a atividade hidrolítica da quitinase. Segundo Busi et al. (2) a expressão da resistência levada a efeito pela aplicação do ASM se deve ao incremento da atividade da enzima quitinase, a qual por uma ação direta, hidrolisa a quitina presente na parede celular dos fungos.

Tabela 1. Severidade da ferrugem do eucalipto em plantas tratadas com indutores de resistência bióticos e abióticos, avaliados 15 dias após inoculação com *Puccinia psidii*.

Tratamentos	Escalas de notas e reação à doença
C0 inoculado	S0 – Resistente
VR inoculado	S2 – Suscetível
VR + Acibenzolar-S-metil (ASM) + inoc.	S0 – Resistente
VR + Agro-Mos [®] + inoculação	S2 – Suscetível
VR + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + inoc.	S0 – Resistente
VR + Dipel [®] + inoculação	S1 – Mod. Suscetível
VR + Ecolife ^{40®} + inoculação	S0 – Resistente
VR + Crop-set [®] + inoculação	S2 - Suscetível
VR sem inoculação	S0 - Resistente
C0 sem inoculação	S0 - Resistente

As plantas tratadas com os indutores não sofreram aumento de atividade da enzima 48 após inoculação com o fungo, ou seja, o incremento do nível de atividade de quitinase nas plantas tratadas com a levedura ou com o ASM foi em decorrência apenas da ação dos indutores. Fato que pode ter sido determinante para a eficiência no controle da ferrugem conforme visto na Tabela 1.

Após a inoculação com *P. psidii*, as plantas dos clones C0 e VR que não foram previamente tratadas com ASM ou *S. cerevisiae* (S.c) não apresentaram diferença significativa na atividade da peroxidase (Figura 2).

A atividade de peroxidases não se mostrou diferente quando as plantas do clone VR foram previamente tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM), entretanto, plantas tratadas com *S. cerevisiae* apresentaram aumento nos níveis de expressão da enzima, comparado com a testemunha que não recebera tratamento. Resultados semelhantes foram apresentados por Roncato & Pascholati (9) usando preparações de células da levedura ou seus filtrados, tratadas ou não termicamente, que alteraram a atividade da peroxidase em tecidos de

Atividade de Quitinase

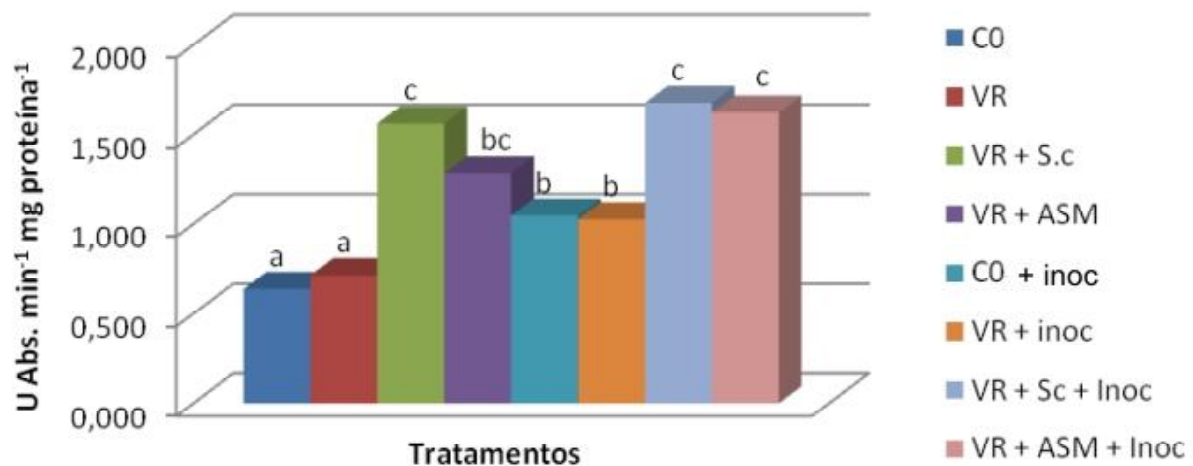


Figura 1. Atividade de quitinase a partir de tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderadamente resistente) e VR (susceptível) inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) cinco dias antes inoculação. As folhas foram coletadas 48 horas após inoculação. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5 % de probabilidade.

Atividade de peroxidase

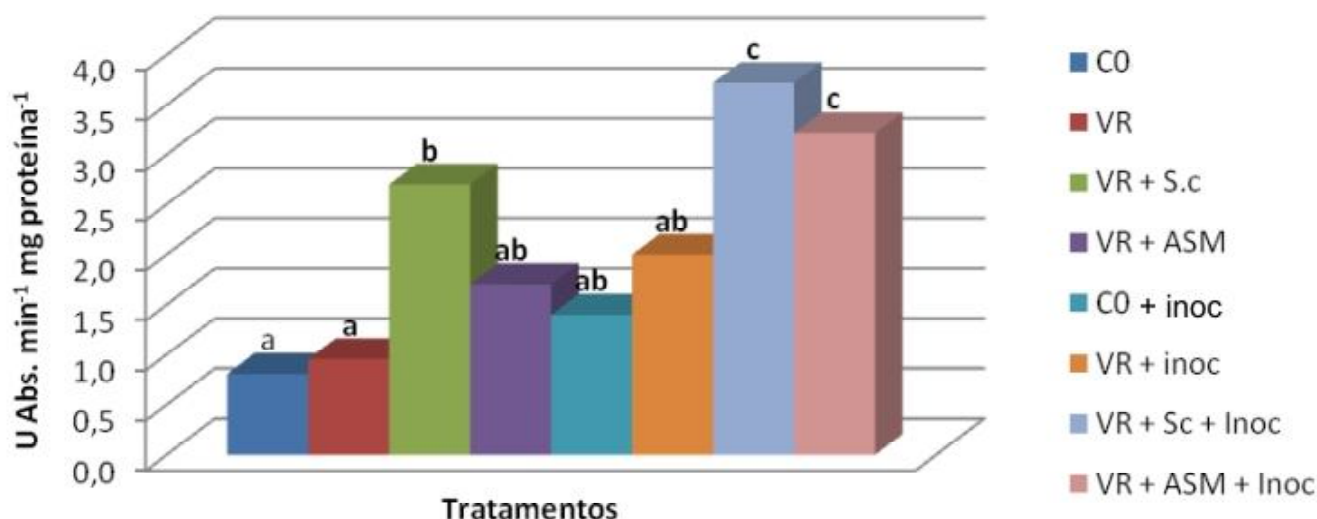


Figura 2. Atividade de peroxidase a partir de tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderadamente resistente) e VR (suscetível) inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) cinco dias antes inoculação. As folhas foram coletadas 48 horas após inoculação. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5 % de probabilidade

milho e sorgo. Segundo os autores, as alterações ocorridas na atividade da enzima nesses tecidos, quando do tratamento com *S. cerevisiae*, provavelmente deveram-se ao fato da planta “reconhecer” a levedura ou seus metabólitos e, portanto, alterar o metabolismo normal em resposta ao possível invasor.

Os maiores níveis de atividade da enzima peroxidase foram encontrados em plantas do clone VR tratadas com ASM ou com *S. cerevisiae* e inoculadas com *P. psidii* (Figura 2), evidenciando que esse mecanismo foi acionado, e possui maior expressão após a inoculação com o patógeno. O pré-condicionamento é um importante componente da resistência sistêmica induzida e está associado ao aumento da capacidade para uma rápida e efetiva ativação das respostas de defesa celular, as quais são induzidas somente após o contato com o patógeno desafiante (3). Nesse caso, quando a planta é induzida pela presença de um elicitador, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada a uma planta induzida com o mesmo elicitador e posteriormente desafiada com um patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder à presença do patógeno (6, 7).

As peroxidases são glicoproteínas capazes de catalizar a redução de H_2O_2 , a formação de lignina, a incorporação de glicoproteínas à parede celular, a destruição peroxidativa do ácido indolacético e de outros reguladores de crescimento. Assim, em função de sua participação na síntese de lignina e oxidação de compostos fenólicos, a peroxidase pode contribuir na resistência das plantas contra fitopatógenos (13)

Entretanto, essas enzimas podem não ter uma relação direta com o estabelecimento da indução de resistência. Ray et al. (8) observaram que plantas de tomate transformadas para expressão de uma peroxidase de pepino tiveram um grande aumento na atividade das enzimas, no entanto, não foi verificado aumento de resistência dessas plantas a patógenos. Dalisay & Kuc (11) demonstraram que as peroxidases não têm relação direta com a indução de resistência em pepino e, portanto, não podem ser usadas como um marcador de resistência nesse patossistema.

Embora as peroxidases não possam ser utilizadas como marcadores de resistência, a alteração na sua atividade é um indicio de metabolismo alterado. Uma das funções das peroxidases é a formação da lignina pela polimerização de fenóis. Assim sendo, é esperado que alterações na atividade de peroxidases envolvam também alteração na atividade de outras enzimas presentes na mesma rota metabólica. Devido a estes fatos, as peroxidases são usadas em estudos de indução de resistência, não como um marcador, mas sim como uma das muitas respostas de defesa manifestadas pelas plantas.

Portanto, ASM e a preparação autoclavada de *S. cerevisiae* mostraram-se alternativas promissoras para o controle da ferrugem do eucalipto através da indução de resistência, provocando expressivo aumento na atividade de quitinases em plantas tratadas e condicionando-as para um aumento na atividade de peroxidases após o desafio com *P. psidii*.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro e bolsa de doutorado concedida. À equipe de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel, por cederem material contrastante para este estudo, nas pessoas de Cesar Bonine, Donizete C. Dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aparecido, C.C., Figueiredo, M.B. & Furtado, E.L. Efeito da idade e temperatura na germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii* coletados de jameiro (*Syzygium jambos*) e de goiabeira. *Summa Phytopathologica*, v.29, p.30-33, 2003.
2. Buzi, A., Chilosi, G., de Sillo, D. & Magro, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology*, Berlim, v.152, n.1, p.34-42, 2004.
3. Cools, H.J. & Ishii, H. Pre-treatment of cucumber plants with

- acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.61, p.273-282, 2002.
4. Dalisay, R.F. & Kuæ, J.A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.47, p.315-327, 1995
 5. Hammerschmidt, H. & Dann, E.K. Induced resistance to disease. In: Rechcigl, N.A. & Rechcigl, J.E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease control*. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, cap.8, p.177-199, 1997.
 6. 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. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, 139p. 2007.
 7. Kuhn, O.J., Pascholati, S.F., Cardoso Filho, J.A., Portz, R.L. & Osswald, W. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. In: LUZ, W. C. (Ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**.1 ed.Passo Fundo, RS: RAPP, v.14, p. 249-300, 2006
 8. Ray, H., Douches, D. S. & Hammerschmidt, R. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. **Molecular Plant Pathology**, v.53, p.93-103, 1998.
 9. Roncato, M.C. & Pascholati, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, v.55, n.3, p. 395-402, 1998.
 10. Smith, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, London, v.132, p.1-45, 1996.
 11. Sobrinho, A. C. Patossistema caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno Tese (Doutorado Fitopatologia)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2004.
 12. Takahashi, S.S. Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados a intensidade da doença no campo. Dissertação de mestrado. Botucatu SP. Faculdade de Ciências Agronômicas. 101p, 2002.
 13. Van Loon, L.C., Rep, M. & Pieterse, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** v.44, p.135-62, 2006.