

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

EDILAINE DELLA VALENTINA GONÇALVES TREVISOLI

**PURIFICAÇÃO DE ELICIADORES DE DEFESA VEGETAL EM SOJA E
FEIJOEIRO A PARTIR DE NEMATOIDES FITOPATOGÊNICOS**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2016

EDILAINE DELLA VALENTINA GONÇALVES TREVISOLI

**PURIFICAÇÃO DE ELICIADORES DE DEFESA VEGETAL EM SOJA E
FEIJOEIRO A PARTIR DE NEMATOIDES FITOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Coorientador: Odair José Kuhn

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T814p

Trevisoli, Edilaine Della Valentina Gonçalves

Purificação de eliciadores de defesa vegetal em soja e feijoeiro a partir de nematoides fitopatogênicos./Edilaine Della Valentina Gonçalves Trevisoli. Marechal Cândido Rondon, 2016.

91 p.

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Coorientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia

1. *Meloidogyne incognita*. 2. *Meloidogyne javanica*. 3. Cromatografia de troca iônica. 4. Cromatografia de filtração em gel. 5. Indução de resistência. 6. Fitoalexina. I. Stangarlin, José Renato. II. Kuhn, Odair José. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 21.ed. 632.9

633.3495

CIP-NBR 12899

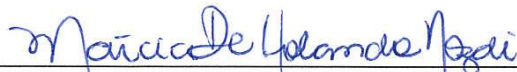
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

EDILAINE DELLA VALENTINA GONÇALVES TREVISOLI

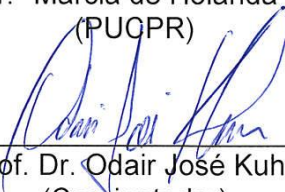
PURIFICAÇÃO DE ELICIADORES DE DEFESA VEGETAL EM SOJA E
FEIJOEIRO A PARTIR DE NEMATOIDES FITOPATOGÊNICOS

Tese apresentada à Universidade
Estadual do Oeste do Paraná, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

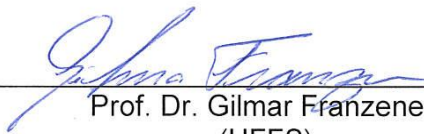
APROVADA: 25 de fevereiro de 2016



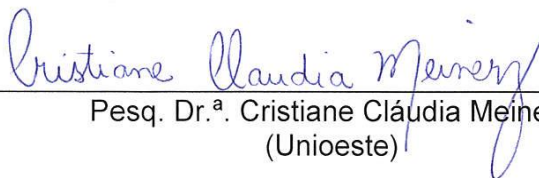
Prof.ª Dr.ª Márcia de Holanda Nozaki
(PUCPR)



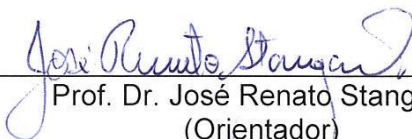
Prof. Dr. Odair José Kuhn
(Coordenador)
(UNIOESTE)



Prof. Dr. Gilmar Franzener
(UFFS)



Pesq. Dr.ª Cristiane Cláudia Meinerz
(Unioeste)



Prof. Dr. José Renato Stangarlin
(Orientador)
(UNIOESTE)

A minha mãe Lucenir de Fátima Della Valentina Gonçalves,
irmã Suély Della Valentina Gonçalves e minhas avós Tereza
Olivo Della Valentina e Mariana Silvério Gonçalves pela
educação e princípios.

Ao meu marido Júlio César Felipin Trevisoli pela compreensão
e incentivo.

A todos os amigos e familiares que presente estiveram em
minha vida ao longo dessa caminhada.

A todos que acreditaram que eu seria capaz.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo sustento nas horas de dificuldades e por permitir a conclusão de mais um grande sonho.

À minha família que me incentivou nos momentos de dificuldade e que abdicaram dos momentos de lazer e convivência diária possibilitando a realização deste trabalho.

Ao Professor e orientador Dr. José Renato Stangarlin pelos conselhos, orientação, paciência e sugestões dadas, além do profissionalismo, amizade e presteza.

Ao Professor Dr. Odair José Kuhn pelos ensinamentos, sugestões e amizade.

Aos Professores Vanda Pietrowski, Cláudio Yuji Tsutsumi, Gilberto Costa Braga, Vandeir Francisco Guimarães pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, através do Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e considerações.

Aos amigos: Bruna, Omari, Sidiane, Heloísa, Alexandre, Laline, Alice, Daiane, Daliana, Janaína, Cristiane, Luciana, Rosana, Denise, Silvia, Franciely, Angélica e Nilza que me mostraram o verdadeiro significado das palavras amizade e companheirismo e por estarem incentivando-me constantemente a nunca desistir.

Aos colegas Anderson, Thaísa, Nicanor, Eloisa, Vanessa Faria e Jeferson pelo auxílio nas atividades relativas a este trabalho.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desta Tese.

*“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência”
(Santo Agostinho)*

RESUMO

TREVISOLI, Edilaine, D. V. G. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2016.

Purificação de eliciadores de defesa vegetal em soja e feijoeiro a partir de nematoides fitopatogênicos. Orientador: José Renato Stangarlin. Coorientador: Odair José Kuhn.

A indução de resistência em plantas contra patógenos é um método de controle alternativo de doenças, e que envolve a ativação dos mecanismos de resistência da planta, como a indução de fitoalexinas. As moléculas eliciadoras possuem a capacidade de induzir e ativar tais repostas, e assim sendo, técnicas têm buscado isolar e caracterizar frações com caráter eliciador. O trabalho teve por objetivo purificar, por cromatografia de troca iônica cromatografia de filtração em gel, moléculas eliciadoras a partir de nematoides fitopatogênicos, e testá-las na indução de faseolina em hipocótilos de feijoeiro e gliceolina em cotilédones de soja. O tampão Tris HCl 0,05 M (pH 6,8) foi utilizado como tratamento controle e o acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) e o *Saccharomyces cerevisiae* (20 mg mL⁻¹) foram utilizados como tratamento padrão de indução. Cromatografia de troca iônica (CTI) e cromatografia de filtração em gel (CFG) foram realizadas para separar frações com poder eliciador a partir de quinhentas fêmeas de nematoides de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. Para a purificação de eliciadores a partir de *Meloidogyne javanica*, por CTI, foram obtidos seis frações glicídicas e seis glicoproteicas. Estas, por sua vez, foram purificadas em CFG, sendo obtidos no total sessenta e três frações. As mesmas foram classificadas de acordo com sua natureza, sendo vinte e seis glicídicas e trinta e sete glicoproteicas, com massas moleculares variando de 29,19 a 2.989,25 kDa. Em relação a purificação de eliciadores de *Meloidogyne incognita* por CTI, foram obtidos nove frações glicídicas e cinco glicoproteicas. A partir destas, foram obtidos por CFG um total de cinquenta e oito frações, sendo vinte e cinco glicídicas e trinta e três glicoproteicas, com massas moleculares variando de 37,42 a 200,32 kDa. Das frações purificadas a partir de *Meloidogyne javanica* oito apresentaram potencial indutor de faseolina. Para gliceolina quinze frações mostraram efeito indutor. Em relação as frações purificadas a partir de *Meloidogyne incognita*, nenhuma fração apresentou potencial indutor de faseolina superior ao tratamento padrão. Entretanto, vinte e duas frações suprimiram a atividade de indução de fitoalexina. Para gliceolina dez frações induziram a mesma, enquanto que, vinte e três frações suprimiram a indução da gliceolina. A cromatografia foi eficiente na purificação de compostos eliciadores. Compostos com características supressoras de gliceolina e faseolina foram verificadas nos bioensaios. Para aquelas frações obtidas por CTI e posteriormente submetidas a CFG que não induziram fitoalexina, sugere-se que as moléculas necessitam atuar juntas para haver efeito eliciador e assim induzir a resposta de defesa no vegetal.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*; *Meloidogyne javanica*; cromatografia de troca iônica; cromatografia de filtração em gel; indução de resistência; fitoalexina.

ABSTRACT

TREVISOLI, Edilaine, D. V. G. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, in february 2016.

Plant defense elicitors purification in soybean and bean from pathogenic nematodes.

Advisor: José Renato Stangarlin. Co-Advisor: Odair José Kuhn

The induction of resistance in plants to pathogens is an alternative method of disease control, which involves activation of plant resistance mechanisms such as induction of phytoalexins. The elicitors molecules are able to induce and activate those responses, and therefore, techniques have sought to isolate and characterize fractions with elicitor character. The study aimed to purify, through ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, eliciting molecules from pathogenic nematodes, and test them in phaseolin induction in beans hypocotyls and glyceolin in soybean cotyledons. The buffer solution Tris HCl 0.05 M (pH 6.8) was used as control and the acibenzolar-S-methyl (50 mg a.i. L⁻¹) and *Saccharomyces cerevisiae* (20 mg mL⁻¹) were used as induction standard treatments. Ion exchange chromatography (IEC) and gel filtration chromatography (GC) were performed to separate fractions with eliciting power from 500 female nematodes of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. For purification of elicitors from *Meloidogyne javanica*, through IEC, six glycidic fractions and six glycoproteins were obtained. These were purified on GC, obtaining sixty-three fractions. They have been classified according to their nature, as twenty-six glycidic and thirty-seven glycoprotein with molecular weights ranging from 29.19 to 2989.25 kDa. Regarding the elicitors purification of *Meloidogyne incognita* through IEC, nine glycidic and five glycoprotein fractions were obtained. From these fractions, a total of fifty-eight fractions was obtained through GC, twenty-five glycidic and thirty-three glycoprotein with molecular weights ranging from 37.42 to 200.32 kDa. From the fractions purified from *Meloidogyne javanica* eight had inducing potential of phaseolin. For glyceolin fifteen fractions showed inducing effect. Regarding the fractions purified from *Meloidogyne incognita*, no fraction has inductive potential of phaseolin superior to the standard treatment. However, twenty-two fractions suppressed phytoalexin inducing activity. For glyceolin ten fractions induced the same, whereas, twenty-three fractions suppressed the induction of glyceolin. Chromatography was efficient in the purification of elicitors compounds. Compounds with suppressing characteristics of glyceolin and phaseolin were checked in bioassays. For those fractions obtained through IEC, and then submitted to GC that did not induce phytoalexin, it is suggested that molecules need to act together to have elicitor effect and thus induce defense response in the plant.

Keywords: *Meloidogyne incognita*; *Meloidogyne javanica*; ion exchange chromatography; gel filtration chromatography; induction of resistance; phytoalexin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Curva padrão para a determinação de massa molecular em coluna de filtração em gel (1,5 cm x 50,0 cm) de Sephacryl S-100-HR. Padrões moleculares: tireoglobulina (670 KDa), globulina (158 KDa), ovalbumina (44 KDa), mioglobina (17 KDa) e vitamina B12 (1,35 KDa). O volume vazio (V_0) da coluna foi determinado com azul de dextrana. Amostra de 1,5 mL eluídas em Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8. Frações coletadas de 1 mL, a um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$37
- Figura 2 - Curva padrão para a dosagem de carboidratos redutores através do método de Lever (1972).38
- Figura 3 - Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976), utilizando reagente concentrado.39
- Figura 4 - Cromatografia de troca iônica a partir de amostras de fêmeas de nematoide *Meloidogyne javanica*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sob coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com Tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 7,5), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100%) no mesmo tampão. Proteína (○) foi determinada em 280 nm e carboidratos (●) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (-) foram determinadas indiretamente por condutividade...42
- Figura 5 - Cromatografia de troca iônica a partir de amostras de fêmeas de nematoide *Meloidogyne incognita*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sob coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com Tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 7,5), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de $1,5 \text{ mLmin}^{-1}$. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100 %) no mesmo tampão. Proteína (○) foi determinada em 280 nm e carboidratos (●) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (-) foram determinadas indiretamente por condutividade...53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CFI), a partir de *Meloidogyne javanica*43
- Tabela 2 - Cromatogramas de frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI) com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne javanica*.44
- Tabela 3 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), massa molecular (KDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne javanica*47
- Tabela 4 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CFI), a partir de *Meloidogyne javanica*.50
- Tabela 5 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), massa molecular (KDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne javanica*.51
- Tabela 6 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CFI), a partir de *Meloidogyne incognita*.55
- Tabela 7 - Cromatograma de frações proteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI) com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne incognita*.56

Tabela 8 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), massa molecular (KDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de <i>Meloidogyne incognita</i>	59
Tabela 9 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CFI), a partir de <i>Meloidogyne incognita</i>	61
Tabela 10 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), massa molecular (KDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de <i>Meloidogyne incognita</i>	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Doenças de Plantas	14
2.2 Controle de Doenças de Plantas.....	15
2.2.1 Alternativas de Controle de Doenças	17
2.3 Indução de Resistência.....	20
2.3.1 Mecanismos de Resistência nas Plantas	22
2.3.2 Fitoalexinas	24
2.3.3 Elicidores.....	27
2.4 Métodos de Cromatografia de filtração em gel e Cromatografia de troca iônica	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Obtenção da população de nematoides (<i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>).....	35
3.2 Extração de fêmeas de nematoides formadores de galhas	35
3.3 Cromatografia de Troca Iônica (CTI)	35
3.3.1 Purificação de Elicidores, a Partir de Nematoides Fitopatogênicos <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>, Através de Cromatografia de Troca Iônica (CTI).....	35
3.4 Cromatografia de Filtração em Gel (CFG)	36
3.4.1 Metodologia de Calibração da Coluna de Filtração em Gel	36
3.4.2 Purificação De Elicidores, a Partir De Fêmeas De Nematoides Fitopatogênicos <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>, Pela Cromatografia De Filtração Em Gel (CFG)	36
3.5 Açúcares redutores.....	38
3.6 Determinação de Proteínas Totais	38
3.7 Bioensaio para Produção de Fitoalexinas	39
3.7.1 Indução De Fitoalexinas Em Cotilédones De Soja	39
3.7.2 Indução De Fitoalexinas Em Hipocótilos De Feijoeiro	40
3.8 Análise estatística dos dados de fitoalexina.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Frações obtidas a partir de fêmeas de nematoide <i>Meloidogyne javanica</i>	41
4.1.2 Bioensaio De Fitoalexina Em Hipocótilos De Feijoeiro	42
4.1.3. Bioensaio De Fitoalexina Em Cotilédones De Soja	49

4.2. Frações obtidas a partir do nematoide <i>Meloidogyne incognita</i>	53
4.2.1. Bioensaio De Fitoalexina Em Hipocótilos De Feijoeiro	54
4.2.2. Bioensaio De Fitoalexina Em Cotilédones De Soja	60
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

Na fitopatologia a resistência é regra e a suscetibilidade a patógenos é exceção. O aparecimento e o desenvolvimento de uma doença são resultado da interação entre hospedeiro suscetível, patógeno virulento e ambiente favorável. A incompatibilidade desses três componentes resulta na não manifestação da doença. Ademais, um dos primeiros eventos que ocorre é o reconhecimento do patógeno pela planta hospedeira e a ativação dos seus mecanismos de defesa (PASCHOLATI, 2011).

Assim sendo, a indução de resistência de plantas a doenças se tornou uma ferramenta de fundamental importância para pesquisas voltadas a estudos sobre problemas fitossanitários, uma vez que um dos principais enfoques da agricultura agroecológica é o controle alternativo de doenças pela indução dos mecanismos de defesa vegetal. Bonaldo, Pascholati e Romeiro (2005) sugerem que o controle de patógenos como vírus, bactérias, fungos e nematoides podem ser estabelecidos por mecanismos de indução de resistência e que, segundo Stangarlin et al. (1999), são ativados por moléculas eliciadoras, que exibem atividade contra fitopatógenos.

Os eliciadores são moléculas liberadas do patógeno ou da própria planta, por ação do patógeno, e que são reconhecidas por receptores presentes na membrana da célula vegetal (DURRANT; DONG, 2004; JALALI; BHARGAVA; KAMBLE, 2006). Os eliciadores de patógenos pertencem a uma classe de moléculas sinalizadoras que participam da troca de sinais entre planta e patógeno (KAMOUN, 2006). Segundo Hahn (1996), as moléculas eliciadoras induzem respostas de defesa vegetal, tal como a indução da síntese de fitoalexinas, que para Barros et al. (2010) e Mazaro et al. (2013) são compostos biocidas atuantes na defesa bioquímica da planta contra patógenos. A gliceolina isolada da soja (PAXTON, 1995) e a faseolina do feijoeiro (MÜLLER, 1958), são exemplos de fitoalexinas atualmente estudadas e que desempenham papel importante como resposta de defesa interação planta-patógeno (FRANZENER et al., 2000).

Atualmente, existem indutores de resistência disponíveis no mercado, cujas moléculas purificadas e testadas apresentaram caráter eliciador capaz de ativar e/ou induzir respostas de defesa nas plantas. Sobrinho et al. (2005) apresentam produtos contendo moléculas indutoras sendo comercializados, entre eles Bion® (acibenzolar-S-metil, ASM: ácido benzo (1, 2, 3) tiadiazol-7-carbotióico), Messenger® (formulado a base da proteína harpina da bactéria *Erwinia amylovora*) e Elexa® (derivado de quitina e quitosana).

A caracterização de eliciadores presentes em fêmeas de nematoides pode otimizar o avanço nos estudos de produtos com moléculas eliciadoras e, assim, desenvolver novas alternativas que seja viável e sustentável para controle de doenças. A capacidade de moléculas eliciadoras provenientes de fêmeas de nematoides na indução de fitoalexinas ainda é desconhecida. Desta maneira, a purificação de eliciadores, por cromatografia, tem como objetivo obter frações protéicas e glicídicas, concentrar o princípio ativo e caracteriza-las como sendo moléculas de potencial indutor de resistência vegetal.

O presente estudo teve por objetivo purificar, por cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel, moléculas eliciadoras a partir dos fitonematoides *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* e testá-las na indução das fitoalexinas faseolina em hipocótilos de feijoeiro e gliceolina em cotilédones de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS DE PLANTAS

Paralelamente a expansão da cadeia produtiva as plantas passaram a ser acometidas por vários problemas fitossanitários, o que inviabilizou os sistemas de cultivo de muitas áreas. Entre estes se enquadram nematoides fitopatogênicos de importância econômica para a cultura da soja e feijão, e que pertencem ao gênero *Meloidogyne* sp. (SCHMITT; NOEL, 1984; LORDELLO, 1988). O gênero *Meloidogyne* sp. abrange inúmeras espécies, dentre as quais destacam-se *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* (CAMPOS, 1999), com predomínio em diversas áreas de produção de soja e feijão, onde são encontrados parasitando suas raízes, reduzindo o potencial produtivo da cultura (SCHMITT; NOEL, 1984).

As espécies *M. incognita* e *M. javanica* são patógenos biotróficos (HAEGEMAN et al., 2012), formadores de galhas, responsáveis por causar grandes perdas na produção (SIMÃO et al., 2010; BAIDA et al., 2011). Os nematoides formadores de galhas induzem a formação de sítios de alimentação nas células de várias espécies de plantas, de maneira que estas se ampliam e são convertidas em células gigantes multinucleadas, que passam ser fonte de alimento para o seu desenvolvimento até o estágio adulto (CAILLAUD et al., 2008; HAEGEMAN et al., 2012).

Estimativas mostram que os danos ocasionados por estes fitonematoides variam entre 40% a 90%, de maneira que em alguns casos a doença pode levar à morte das plantas (COSTA et al., 2001; SIMÃO et al., 2005). Baida et al. (2011) complementam que a suscetibilidade dos materiais tem contribuído para a disseminação dos nematoides, uma vez que a escassez de informações e o desconhecimento dos produtores, ao fazerem uso de plantas hospedeiras suscetíveis em cultivos sucessivos, aumentam os casos de ocorrência do fitonematoide. Cabe ressaltar que (MENDES; RODRIGUEZ, 2000; FERRAZ et al., 2012) devido à vasta distribuição geográfica e a ampla gama de hospedeiros que os mesmos parasitam, poucas são as culturas que podem ser utilizadas como medidas de controle no sistema de rotação de cultura.

Juliatti et al. (2010) afirmam que ainda são poucas as fontes de resistência de feijoeiro a *Meloidogyne* sendo exploradas. De acordo com Asmus (2001) e Castro, Lima e Carneiro (2003), a cultura da soja apresenta grande suscetibilidade a *M. javanica*, pois segundo Roese, Oliveira e Lanes (2004), embora existam cultivares resistentes, muitas das cultivadas no Brasil apresentam histórico de suscetibilidade a *M. incognita* e *M. javanica*.

O maior registro de ocorrência da doença é em regiões de temperaturas mais elevadas (RIBEIRO; FERRAZ, 1983; PEDROSA; MOURA; SILVA, 2000), sendo a faixa ótima de

temperatura, em ambiente solo, entre 15 a 30 °C, enquanto que a umidade ideal para sua sobrevivência varia entre 40% a 60% (FERRAZ et al., 2012). Nas áreas infestadas por *M. incognita* e *M. javanica*, geralmente, são observadas manchas em reboleiras, cujas folhas das plantas mostram-se cloróticas e/ou necrosadas, menor porte da planta, nanismo, menor massa, intenso brotamento de vagens, amadurecimento prematuro das plantas, menor enchimento de grãos e danos mecânicos, murcha das plantas nas horas mais quentes do dia e redução das raízes laterais.

As raízes infectadas apresentam galhas em número e tamanho variado, e as fêmeas possuem formato de pêra de coloração branco-peróla (CHARCHAR; HORINO; MOITA, 1995; FERRAZ; MONTEIRO, 1995; DIAS et al., 2010; BAIDA et al., 2011). Cabe ressaltar, que a principal e melhor maneira de controle de nematoide é evitar a sua entrada em áreas isentas do mesmo, pois uma vez presente, é difícil seu controle e despende de altos investimentos, além de que a erradicação se torna praticamente impossível e as medidas adotadas visam apenas reduzir a população no solo (FERRAZ et al., 2012).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, por formarem galhas e obstruírem a passagem de água e nutrientes nos vasos condutores, promovem redução do crescimento da parte aérea da planta (TIHOHOD, 2000). Nas galhas são observadas massas de ovos, que ao sofrer ecdise, eclodem juvenis de segundo estágio (J2), que migram até o hospedeiro e infectam novas raízes. Por sua vez, ao inserir seu estilete no citoplasma da célula hospedeira o nematoide injeta substâncias tóxicas que resultam em mudanças morfológicas e fisiológicas nas raízes das plantas, as quais formam células nutridoras, e estabelecem, assim, um sítio de alimentação (FERRAZ, 2001; FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

2.2 CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

A utilização de insumos químicos passou a ser uma prática comum entre os agricultores, que objetivam controlar a incidência de doenças (KUHN; PORTZ; STANGARLIN, 2009), visto que muitos são os investimentos em produtos químicos, e imperiosa é a busca para o controle de patógenos, pois estes limitam e comprometem o desenvolvimento de uma agricultura rentável (MOREIRA et al., 2008). Atrelado ao aumento da incidência das doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (JUHÁSZ et al., 2013) os produtores se deparam e enfrentam um grande desafio, que é, controlar as doenças e manter a produção de alimentos em nível sustentável (LOPES et al., 2012). O controle de nematoides pode ser feito pelo uso de nematicidas, mas por ser um método caro e de carácter

tóxico ao ambiente surge a necessidade de novos métodos alternativos (ADEGBITE; ADESIYAN, 2005).

De acordo com Stangarlin et al. (2011) plantas usadas no controle de pragas são consideradas como alternativas para o controle de doenças, pois têm compostos secundários que ativam mecanismos de defesa latentes nas plantas tratadas, e que podem apresentar atividade antimicrobiana contra patógenos de plantas. Müller et al. (2016) complementam que o extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*, apresentou potencial para o controle de *M. incognita* em cultivares de soja (CD 206 e CD 215) com redução do número de eclosão de J2, o número de galhas e do fator de reprodução.

Nunes, Monteiro e Pomela (2010) comentam que o controle biológico pode ser uma alternativa mais barato, de fácil aplicação, não é tóxico, não deixa resíduos e não resulta em desequilíbrio ambiental. Ainda, Hallmann et al. (2004), complementam que bactérias endofíticas apresentam potencial para o controle de fitonematoides, principalmente endoparasitas. Além disso, destacam-se sistemas de rotação e sucessão de culturas (LEANDRO; ASMUS, 2015). Ainda, Dias-Arieira et al. (2013) afirmam que seu controle é complexo e exige planejamento.

No entanto, os produtores acreditavam que o controle químico seria o método mais eficaz, e então passaram a subestimar as práticas de manejo, que são consideradas indispensáveis para o controle de doenças tais como, o sistema de rotação de culturas, sementes certificadas, desinfecção de ferramentas e utensílios e cultivares resistentes (MOREIRA et al., 2008). Em virtude disso, mesmo com o emprego de insumos modernos, este passou a ter seu uso limitado e deixou de conferir resultados promissores para a produtividade das lavouras, pois o uso indiscriminado dos insumos químicos trouxeram falhas no controle da doença e impacto sobre a biodiversidade que culminou em maiores custos de produção, devido a seleção de raças de patógenos cada vez mais resistentes e com maior variabilidade genética, em virtude das mutações (BONALDO et al., 2004; BONALDO et al., 2007; BORSATO; DI PIERO; STADNIK, 2010).

Cabe mencionar que com a aplicação dos insumos químicos, em curto prazo, há um efeito positivo para o aumento da produtividade agrícola, entretanto, em longo prazo, o efeito acumulativo destas substâncias químicas são nocivas à saúde humana e animal pela ingestão de alimentos contaminados (GHINI; KIMATI, 2000; MOREIRA et al., 2008), desequilíbrio dos agroecossistemas e maior pressão de seleção de indivíduos com caráter de resistência às substâncias químicas utilizadas (WALTERS; NEWTON; LYON, 2007; GUGINSKI-PIVA et

al., 2015), pois sua efetividade é temporária e apresentam modos e sítios específicos de ação (GUGINSKI-PIVA et al., 2015).

Diante desta problemática, novos métodos de controle de doenças passaram a ser ferramentas de estudos, a fim de minimizar os efeitos negativos causados ao ambiente, decorrentes do uso de agroquímicos. Nesse sentido, métodos alternativos como cultural, biológico e físico passaram a ser empregados no controle da doença (STANGARLIN et al., 2010), com o intuito de construir uma agricultura alternativa e/ou sustentável. Viecelli et al. (2009) e Matiello e Bonaldo (2013) ressaltam a importância dos métodos de controle baseados na indução dos mecanismos de resistência em plantas com produtos naturais. Os resultados alcançados resultaram na produção de alimentos com maior segurança alimentar (ANDRADE et al., 2013), maior economia em função dos menores custos de aplicação e produtos agrícolas com baixa toxicidade ao homem e animais, isentos de resíduos tóxicos (ALMEIDA et al., 2012).

2.2.1 Alternativas de Controle de Doenças

Com o intuito de proteger as plantas e manter um sistema de defesa de doenças menos dependente de moléculas químicas (BALLARÉ, 2014), novas alternativas de controle tem substituído a utilização de químicos e contribuído para uma agricultura moderna e sustentável (ALABOUVETTE; OLIVAIN; STEINBERG, 2006; BORSATO; DI PIERO; STADNIK, 2010). Para tanto, uma das perspectivas do controle alternativo é o controle biológico e a indução dos mecanismos de resistência das plantas (MORAES, 1992), além do uso de extratos naturais que apresentam propriedades antimicrobianas e ou indutoras de resistência (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008).

O controle biológico tem por objetivo estabelecer uma relação entre plantas e organismos não patogênicos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). Nesse sentido, estes buscam proteger as plantas e controlar os agentes fitopatogênicos com outros organismos vivos, o qual podem atuar por antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (COOK; BAKER, 1983). Em relação a resistência induzida, esta pode ser definida como sendo mecanismos de resistência que permanecem inativos ou latentes nas plantas e são acionados ou ativados por moléculas indutoras, com potencial eliciador, que induzem a resistência das plantas quando tratadas com agentes bióticos ou abióticos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Para Barros et al. (2010), a ativação dos mecanismos de defesa ocorre nos sítios de infecção, bem como, nos locais próximos a região que foi induzida. De acordo com esses autores, em função da adaptabilidade das plantas, estas conseguem sobreviver mesmo quando o seu desenvolvimento está comprometido devido a infecção causada pelo patógeno. Nos mecanismos de indução várias são as respostas de defesa das plantas, como a resposta de hipersensibilidade (FILIPPI; SILVA; PRABHU, 2007), síntese de fitoalexinas (DURANGO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2007; STANGARLIN et al., 2010; ARRUDA et al., 2012;) atividade de lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases, β -1,3-glucanases, e síntese de fenóis (CAVALCANTI; RESENDE; OLIVEIRA, 2007; COLPAS et al., 2009; VIECELLI et al., 2009; GALHÃO et al., 2010; KUHN; PASCHOLATI, 2010; ALMEIDA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2015), síntese de proteínas relacionadas à patogênese (BARROS et al., 2010) e de espécies reativas de oxigênio (LALOI; APEL; DANON, 2004; BALDO et al., 2011; WU; SHAN; HE, 2014).

Vários são os métodos alternativos de controle, e entre os potenciais estão os metabólitos e polímeros de estruturas celulares de *Saccharomyces boulardii* com atividade eliciadora na indução de fitoalexinas gliceolina e deoxiantocianidinas em soja e sorgo, respectivamente (STANGARLIN et al., 2010). Arelado aos benefícios a saúde, ao ambiente e ao menor custo de tecnologia, os fungos do gênero *Trichoderma* são amplamente empregados no controle biológico. Nesse sentido, o *Trichoderma atroviride* apresenta potencial para reduzir a severidade da Sigatoka negra em bananeira (CAVERO et al., 2015).

Heling, Kuhn e Stangarlin (2015) estudaram *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* como agentes de controle biológico de *Mycosphaerella fragariae*, doença foliar em plantas de morangueiro. Os agentes de controle *S. cerevisiae*, *B. cereus*, controle (Azoxistrobina + Ciproconazole) e *S. boulardii* reduziram a severidade dos sintomas no final do ciclo da cultura em 53,05%, 49,59%, 49,71% e 33,16%, respectivamente, quando comparado a testemunha (sem o agente de controle). De maneira complementar às informações de severidade, foi reportado redução da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para as plantas tratadas com *S. cerevisiae* e *B. cereus*, resultado semelhante aquele apresentado pelo tratamento controle, com diferença significativa em 49,76%, 48,07% e 47,24% respectivamente, em relação a testemunha. A aplicação de *S. boulardii* reduziu 30,10% a AACPD em relação a testemunha, porém sem apresentar diferenças aos demais tratamentos. Ao avaliarem os valores de proteínas totais, quitinases, β -1,3-glucanases e peroxidases, de amostras dos folíolos, não foram observadas alterações significativas para nenhuma das variáveis e para nenhum dos tratamentos aplicados em relação a testemunha. O

mesmo justifica que sob as condições avaliadas os tratamentos não responderam de maneira a causar efeitos nas atividades das enzimas avaliadas.

Programas de controle biológico de nematoides a partir de inimigos naturais é mais uma das estratégias a qual têm sido exploradas. Dentre os inimigos naturais estão elencados os fungos, bactérias, nematoides predadores, protozoários e ácaros (CARNEIRO et al., 1999). *Bacillus subtilis* apresenta mecanismos de ação, como a produção de endotoxinas que interferem na ovoposição e eclosão dos juvenis, característica esta que pode ser utilizada na produção de substâncias nematotóxicas (SHARMA; GOMES, 1996). Embora Vaz et al. (2011) não tenham encontrado resultados promissores para *B. subtilis* como agente de biocontrole de *M. javanica* e *M. incognita*, Coimbra, Campos e Souza (2005) com 34 isolados e Freitas et al. (2005) com seis isolados, verificaram redução no número de galhas por planta de *M. javanica* e *M. incognita*, e *M. javanica*, respectivamente.

O controle biológico no manejo de nematoides foi reportado por Araújo e Marchesi (2009) que além de estudarem o efeito de *B. subtilis* como promotores de crescimento em plantas, verificaram que o tratamento biológico demonstrou potencial antagonista, com redução do número de juvenis e no desenvolvimento de massas de ovos de nematoides formadores de galhas nas raízes de tomateiro. A atividade nematicida das bactérias está associada a metabólitos sintetizados por estas que induzem a resposta de hipersensibilidade nas células das plantas e tornam as fêmeas sensíveis e incapazes de produzir ovos, além de degradar a massa gelatinosa que envolve os mesmos. Por este e entre outros motivos o *B. subtilis* é considerado um agente de suma importância para o controle biológico e a sua utilização é um método alternativo e que pode ser empregado em sistemas de manejo integrado para reduzir a reprodução dos nematoides.

Outros trabalhos também reportaram o uso de microrganismos antagonistas como agentes de biocontrole de doenças, tal como Lopes et al. (2012) ao purificarem compostos metabólicos secundários de *Pseudomonas* sp., por cromatografia líquida a vácuo, e observaram atividade antibiótica no controle de *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto, sendo esta uma nova alternativa de controle.

Alguns trabalhos também têm demonstrado o uso de extratos de plantas com propriedades nematicidas como alternativas para controle de nematoides, como Borges et al. (2013) no controle de *Tubixaba tuxaua* e *M. incognita* com extrato aquoso de crotalaria, açafreão da terra, nim, fermentado de caldo de cana-de-açúcar por leveduras, Mateus et al. (2014) no controle de *M. incognita* com extratos aquosos das plantas medicinais, gervão, pau-amargo,

picão e tansagem e Almeida et al. (2012) que avaliaram o efeito nematocida e nematostático de extratos vegetais de folhas de urtiga, nim, mamona e mandioca.

A aplicação de extratos naturais de plantas com potencial antimicrobiano direto e indutor de defesa das plantas também foram testados por Stangarlin, Kuhn e Schwan-Estrada (2008). A presença do polissacarídeo ulvana em algas marinhas foi estudada por Borsato, Di Piero e Stadnik (2010) como alternativa de controle de *Uromyces appendiculatus* na indução de resistência em cultivares de feijoeiro.

Por apresentar baixo potencial de contaminação e não causar problemas à saúde humana Guginski-Piva et al. (2015) estudaram o extrato etanólico de própolis no controle de oídio em pepino, o qual apresentou eficácia sobre o mesmo quando aplicado de forma preventiva. Ainda, segundos os autores o extrato de própolis também pode ser considerado um produto de controle alternativo e como um indutor de gliceolina em cotilédones de soja.

Cabe ressaltar que as estratégias que vêm sendo propostas com o intuito de reduzir as práticas de químicos no controle de doenças, ainda são recentes. A corrida desenfreada por produção de alimentos mais saudáveis e conservação dos sistemas ambientais é uma das principais preocupações nos dias atuais, porém, embora seja alvo de estudos, poucos são os agentes de controle biológico disponíveis no mercado. Nesse sentido, a intenção é avaliar o avanço e as falhas nos estudos e o propósito do controle biológico para prevenir possíveis erros que venham a ser cometidos (ALABOUVETTE; OLIVAIN; STEINBERG, 2006).

2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Com o intuito de diminuir o uso indiscriminado de agroquímicos e conscientizar a população sobre o cenário dos problemas ambientais, segurança alimentar e manejo fitossanitário é que muitas pesquisas estão fundamentadas em novos métodos alternativos para o controle de doenças de plantas pela indução de resistência (ANDRADE et al., 2013). A indução de resistência passou a ser estudada como uma alternativa para controle de doenças (SILVA; CANTERI; LEITE JÚNIOR, 2012), visto que para Stangarlin et al. (1999) e Latif et al. (2014) agentes indutores, conhecidos como eliciadores, são capazes de ativar mecanismos de defesa latentes existentes na planta, protegendo-a contra subseqüentes infecções causadas por patógenos, abordagem esta que passou a ser definida como resistência induzida.

A indução de resistência se baseia na ativação de mecanismos de defesa, associada a expressão de um conjunto de genes de defesa, que visa restringir o crescimento e ou atividade

do patógeno, bem como diminuir a incidência da doença (MÉTRAUX, 2001), porém raramente a indução promove controle completo da doença (WALTERS, 2009).

A interação entre patógeno e plantas pode ser do tipo compatível quando o hospedeiro é suscetível à doença, ou incompatível, quando o mesmo apresenta resistência ao ataque do patógeno (HEIL; BOSTOCK, 2002). Na incompatibilidade ocorre a percepção e/ou reconhecimento de sinais por receptores celulares, que por sua vez são translocados para sítios de ação dentro da célula (transdução do sinal) por mensageiros secundários. Tais sinais são traduzidos em respostas celulares, genes de defesa são ativados e como resultado ocorre a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e de enzimas que participam da produção de fitoalexinas (BOSTOCK, 2005; RESENDE et al., 2007).

A indução de resistência apresenta duas definições: a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e a Resistência Sistêmica Induzida (RSI) (PASCHOLATI et al., 2010). A expressão desta pode levar a planta a ter uma proteção local e/ou sistêmica e de longa duração (DURRANT; DONG, 2004), uma vez que em ambas, a planta tem seu mecanismo de defesa ativado quando tratadas com agentes indutores ou na presença do patógeno que leva a mesma a reconhecer o agente invasor (VALLAD; GOODMAN, 2004).

A indução da resistência sistêmica adquirida depende do ácido salicílico como via de sinalização para a expressão de genes em proteínas-RP, como β -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases. A exposição da planta à agentes virulentos, avirulentos, não patogênicos e a indutores químicos induz a RSA, que será estabelecida somente após o intervalo de tempo necessário para acumular proteínas-RP (PASCHOLATI et al., 2010).

Em relação a resistência sistêmica induzida, esta depende do ácido jasmônico e etileno como vias de sinalização, sem envolver a síntese de proteínas-RP. Neste caso, a resistência do hospedeiro está associada a capacidade de percepção do patógeno que culmina em alterações metabólicas da planta, e o agente indutor geralmente é um microrganismo não patogênico (BONALDO et al., 2004).

Quando a planta tem seus mecanismos de defesa induzidos vários eventos são ativados, dentre eles se destacam a síntese de metabólitos secundários tóxicos a patógenos, espécies reativas de oxigênio, ativação de genes que codificam proteínas-RP, tais como as β -1,3-glucanases (PR-1, PR-2) e as quitinases (PR-3). A resposta de hipersensibilidade (RH), aumento e alterações nas concentrações de fenilpropanóides, produtos do metabolismo como fitoalexinas e compostos fenólicos, ativação de enzimas chaves como as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (FAL) e alterações estruturais como lignificação, deposição de calose e formações de papilas também são ativados (CAVALCANTI et al., 2006).

2.3.1 Mecanismos de Resistência nas Plantas

Embora as plantas se mostrem aparentemente indefesas ao ataque de agentes patogênicos, elas respondem contra invasores por estratégias de defesa, ou seja, mecanismos relacionados com a ativação de genes (DANGL; DIETRICH; THOMAS, 2000; FERNANDES et al., 2009) capazes de reconhecer a invasão de patógenos (WU; SHAN; HE, 2014). As plantas apresentam capacidade de percepção de eliciadores e/ou moléculas associadas aos microrganismos (TON et al., 2002), de maneira que, as respostas levam as mesmas ao reconhecimento do patógeno, a qual pode retardar ou impedir a entrada e a atividade de infecção do mesmo, sejam eles, fungos, bactérias, vírus, nematoides e/ou insetos, nos tecidos do vegetal (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI, 2011).

A indução de resistência do hospedeiro em contato com um patógeno é um processo contínuo e está fundamentada na expressão gênica dos mecanismos da planta, uma vez que, a natureza é dinâmica e coordenada, e o nível de resistência do vegetal depende da velocidade, magnitude e localização da área infectada (PASCHOLATI, 2011), além da influência dos hormônios e do tipo de interação planta patógeno (GLAZEBROOK, 2005; BRODERSEN et al., 2006).

As plantas no seu processo evolutivo desenvolveram estratégias de defesa que envolveram o reconhecimento, ataque e defesa, com o intuito de se proteger dos processos de infecção contra patógenos virulentos (WALTERS; NEWTON; LYON, 2005), caráter este que pode ser explicado pelo elevado grau de especificidade das plantas em relação à presença de patógenos (TON et al., 2002).

Esses mecanismos desenvolvidos pelas plantas foram divididos em duas categorias: os pré-formados (passivos ou constitutivos), em que a resistência se faz presente nas plantas mesmo na ausência do patógeno; e os pós-formados (ativos ou induzíveis), que é caracterizado pela ausência e/ou presença em baixos níveis no vegetal, sendo ativados em resposta ao reconhecimento do patógeno, que ocorrem por rotas de sinalização existentes. Estes por sua vez, ainda são subdivididos em mecanismos estruturais e bioquímicos (GARCION; LAMOTTE; MÉTRAUX, 2007; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008; PASCHOLATI, 2011). Os estruturais, chamados de barreiras físicas, além de fazerem parte da estrutura fisiológica e morfológica da planta, também exibem papel fundamental como fatores de resistência, pois estes buscam promover o atraso da penetração e/ou colonização do patógeno, o que culmina na restrição e no desenvolvimento da doença (STANGARLIN et al., 2011). Os fatores bioquímicos correspondem a substâncias produzidas pela atividade

metabólica das células da planta hospedeira de caráter, muitas vezes, tóxica ao patógeno, a qual inibe o seu crescimento e promove condições adversas para a sobrevivência do mesmo (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008; PASCHOLATI, 2011).

Os grupos são compreendidos em: 1) Mecanismos pré-formados: **a)** Estruturais: cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores, camada de sílica; **b)** Bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas, terpenóides, proteínas, ácido clorogênico, ácido protocatecóico e catecol, α -tomatina, avenacinas, tuliposídeos, glicosídeos fenólicos, inibidores proteicos e enzimas de defesa vegetal; 2) Mecanismos pós-formados: **a)** Estruturais: formação de halos, papilas e lignificação, que são barreiras celulares, e camadas de cortiça, camadas de abscisão, tilose, deposição de gel e cristais de hesperidinas, sendo estas barreiras histológicas; **b)** Bioquímicos: espécies reativas de oxigênio; óxido nítrico; fitoalexinas (CLARKE et al., 2000; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002; SEREGÉLYES et al., 2003; LALOI; APEL; DANON, 2004; SOYLU; SOYLU; MANSFIELD, 2004; KIRALY; BARNA; KIRALY, 2007; PASCHOLATI, 2011; STANGARLIN et al., 2011).

Após a planta reconhecer a presença do patógeno, as células vegetais, acionam cascatas de sinalização e, como respostas, seus mecanismos de defesa são ativados. Esta percepção resulta na transdução de sinais que ocorrem quando moléculas eliciadoras se ligam às moléculas receptoras presentes na membrana da célula vegetal, e informações são translocadas entre essas células, ao passo que, mensageiros secundários são ativados e genes específicos relacionados a defesa são expressos (MÉTRAUX, 2001; DE WIT, 2007).

Os sinais que são liberados pelas folhas infectadas desencadeiam mudanças no fluxo iônico na membrana plasmática, geração de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e radical superóxido) (MÉTRAUX, 2001), produção e acúmulo de compostos fenólicos (ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico) (BARROS et al., 2010), além da ativação de proteínas relacionadas à patogênese, como quitinase, responsável por hidrolisar a quitina (ALMEIDA et al., 2012) e a β -1,3 glucanases que degradam β -glucanas (WU; BRADFORD, 2003) presentes na parede celular de patógenos fúngicos.

Cabe ressaltar que os mecanismos de resistência são mediados por genes, e entre eles destacam-se os genes *R*, caracterizados pelo seu elevado grau de especificidade de reconhecimento (ELVIRA et al., 2008). Essa particularidade dos genes *R* é observada quando ocorre a ativação de várias vias de defesa da planta que geram fluxos de íons celulares, e promovem o acúmulo de superóxidos e peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, resposta de hipersensibilidade e produção de metabólitos de caráter tóxico a patógenos (DANGL; JONES, 2001).

De maneira complementar, a interação planta patógeno pode levar a expressão de diferentes isoformas de proteínas relacionadas à patogenicidade (ELVIRA et al.; 2008), e esta condição está atrelada a capacidade da expressão gênica (HUANG et al., 2005; YANG et al., 2007). Deste modo, os fatores associados às respostas de resistência da planta, como a síntese e atividade de enzimas podem variar em função da espécie, tecido vegetal, os estádios fisiológico e nutricional, efeito da radiação solar, temperatura e pH (ALMEIDA et al., 2012).

2.3.2 Fitoalexinas

Fitoalexina (do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele) foi descoberta no século IX, porém no século XX a sua síntese e as respostas de defesa foram estudadas em cultivares de plantas resistentes e suscetíveis a patógenos (MÜLLER; BORGER, 1940).

As fitoalexinas são metabolitos secundários sintetizadas pelas plantas sob condição de estresse químico, físico e/ou biológico. São moléculas de baixa massa molecular e exibem atividade antimicrobiana, e se acumulam dentro das células vivas, temporariamente, próximo ou no local dos sítios de infecção, como resposta de defesa das plantas a exposição de patógenos (PAXTON, 1995; BRAGA, 2008).

O grupo das fitoalexinas está relacionado com a defesa vegetal (BARROS et al., 2010) e sua síntese pode ser induzida em resposta a ação de agentes bióticos ou abióticos, de maneira que as moléculas capazes de ativar esse mecanismo de resistência são denominadas de eliciadores ou elicitores (BONALDO et al., 2004), como carboidratos, proteínas, enzimas, lipídios, glicoproteínas, polipeptídeos (PASCHOLATI, 2011) oligossacarídeos, oligopeptídeos e ácidos graxos (STANGARLIN et al., 1999), os quais podem ser de origem microbiana (eliciador exógeno) ou da própria planta (eliciador endógeno) (BRAGA, 2008; PASCHOLATI, 2011).

Deffune (2001) sugere que o acúmulo das fitoalexinas pode limitar o crescimento do patógeno devido sua característica de toxidez, além de causar uma resposta de hipersensibilidade no tecido infectado que induz lesão do tipo necrótica. Segundo Pascholati (2011), o principal modo de ação destas são as alterações na membrana plasmática do patógeno que culmina na perda de eletrólitos e morte celular, além da perda da integridade estrutural e funcional da membrana.

As fitoalexinas englobam diferentes classes de metabólitos químicos e naturais, e mais de 350 compostos foram caracterizados, como ácido benzóico, enxofre na forma de ciclo-octaenxofre (S₈), fenóis do tipo flavonóide, poliacetileno, isoprenos, terpenóides, esteroides,

dihidrofenantrenos, estilbenos, cumarinas, alcaloides, furanoacetilenos, antraquinonas e polienos (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005; BRAGA, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009; PASCHOLATTI, 2011), presentes em mais de 31 famílias de plantas, em destaque Leguminosae, Solanaceae, Orchidaceae e Poaceae (PASCHOLATTI, 2011).

Em soja foi isolada a fitoalexina gliceolina, um pterocarpanóide derivado da via fenilpropanóide, rota em que ocorre uma série de isômeros. A isoflavona daidzeína é o precursor da gliceolina (PAXTON, 1995) e genisteína (hidroxila doisflavona) é acumulada em tecidos de soja em resposta ao eliciador (RIVERA-VARGAS; SCHMITTHENNER; GRAHAM, 1993; GRAHAM; GRAHAM, 2000). Segundo Franzener et al. (2000), essa fitoalexina desempenha um importante papel na interação planta-patógeno em resposta a infecção e ao tratamento com agentes eliciadores, que podem ser de origem microbiana ou da própria planta.

Em feijão, a fitoalexina de maior relevância na interação patógeno-planta é a faseolina, que foi identificada, primeiramente, por Müller (1958), e desde então, Durango et al. (2002) sugerem que vários trabalhos têm demonstrado seu efeito no controle de fitopatógenos.

Muitas das fitoalexinas produzidas pelas plantas requerem a atividade de enzimas biossintéticas, a exemplo da síntese *de novo* de fenilalanina amônia-liase (FAL), responsável pela síntese dos fenilpropanóides, juntamente com a participação da fenilalanina e a sua conversão em ácido *trans*cinâmico, reação catalisada pela FAL com produção de compostos que atuam na resistência das plantas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; NAKAZAWA; NOUZUE; YASUDA, 2001; BAIS et al., 2005). A pisatina (ervilha), faseolina (feijão) e a gliceolina (soja) podem ser produzidas a partir das flavanonas, pela atividade da enzima isoflavonóide sintase, que a transforma em isoflavonóides (GARCION; LAMOTTE; MÉTRAUX, 2007).

Cabe ressaltar que, as fitoalexinas são sintetizadas após os metabólitos primários participarem de uma nova rota de processamento secundário, condição está observada para o substrato fenilalanina que participa da síntese das fitoalexinas, que são os metabólitos secundários produzidos. Nesta via sintética, há caminhos que atuam na especialização e coordenação dessas respostas, cuja participação envolve um elemento sequência “*cis-acting*” de DNA comum com um promotor específico para cada gene que codifica enzimas para a síntese das fitoalexinas. A exemplo disso, é a FAL multigene regulada nos níveis de mRNA e em nível proteico que atuam na rota de biossíntese das fitoalexinas de flavonóides (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

Os genes hidroximetilglutaril-CoA redutase 2, sesquiterpene ciclase, e 5-epiaristológeno sintase, estão envolvidos na biossíntese do composto capsidiol, um terpenóide que pertence à classe das fitoalexinas, expresso nas plantas de pimenta em resposta a infecção por patógenos (FERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2012). O sítio de infecção estabelecido nas raízes das plantas por nematoides fitopatogênicos, como *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera*, induzem alterações morfológicas nas células da mesma, pois estas passam a ser fonte de alimento para os nematoides, e durante o processo de infecção, mudanças na expressão dos genes passam a ocorrer (JAMMES et al., 2005). Essas alterações ativam as rotas para a biossíntese de fitoalexinas durante a infecção que são compostos biocidas com potencial tóxico contra bactérias, fungos e nematoides (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

O potencial das fitoalexinas na indução dos mecanismos de resistência das plantas, durante a infecção causada por agentes patogênicos, pode ser avaliado por meio de critérios que as definem como sendo compostos antimicrobianos. Como características primordiais as fitoalexinas devem-se acumular e inibir a invasão do patógeno em resposta a infecção (GARCION; LAMOTTE; MÉTRAUX, 2007).

Bednarek et al. (2005) complementam que várias são as espécies de plantas capazes de produzir fitoalexinas, no entanto, em alguns casos, a sua relevância para a defesa da planta é desconhecida. Para Braga (2008), em nível de resposta, a produção de fitoalexinas nas espécies de plantas resistentes e suscetíveis é a mesma, porém, o que as diferencia é a rapidez com que essas moléculas são sintetizadas pelo metabolismo do vegetal.

Baseado na literatura, vários são os trabalhos que demonstram o potencial de plantas na indução de mecanismos de defesa atrelados a sua capacidade de induzir a síntese e o acúmulo de fitoalexinas. Exemplo disso são os derivados da folha de pitangueira com carácter eliciador na indução de gliceolina (pterocarpanóide) em cotilédones de soja (FRANZENER et al., 2000; MAZARO et al., 2008). Estes atuam na liberação de sinais moleculares, que são reconhecidos por processos de transdução e tradução de sinais, que ativam os genes relacionados à defesa (BOSTOCK, 2005), e culminam na síntese *de novo* de uma variedade de proteínas e compostos antimicrobianos (VILLAR-LUNA et al., 2015), onde rotas metabólicas para a síntese de fitoalexinas são ativadas (MAZARO et al., 2008).

A produção da fitoalexina gliceolina também foi reportado por Mazaro et al. (2013), por preparados de *Calendula officinalis*, em que a composição química apresenta ingredientes ativos capazes de ativar as rotas de defesa da planta. Segundo Meinerz et al. (2014), compostos fenólicos presentes em plantas de avenca (*Adiantum capillus-veneris*), de natureza molecular

ainda desconhecida, apresentam caráter eliciador na indução de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

Simões et al. (2005) relataram em esporos do fungo sapróbio *Mucor ramosissimus* a presença de fragmentos de polissacarídeo do tipo mucorano, eliciadores com potencial indutor na biossíntese e acúmulo de fitoalexinas em soja. Os autores complementam ainda, que os tecidos dos cotilédones de soja reconheceram os fragmentos de heteropolímeros de ácidos urônicos como eliciadores de fitoalexinas.

Stangarlin et al. (2010) utilizaram cotilédones de soja para avaliar o potencial elicitor da levedura *Saccharomyces boulardii* na forma do produto comercial Floratil (Merck), massa de células e de filtrado do meio do crescimento das leveduras e verificaram efeito dose-dependente na indução da fitoalexina gliceolina. Para mesocótilos de sorgo, apenas o filtrado e Floratil tiveram efeito dose-dependente na síntese de deoxiantocianidinas. Arruda et al. (2012) verificaram que extratos aquosos de *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus* induziram o acúmulo da fitoalexina gliceolina, em dose dependente para cotilédones de soja.

Beninca et al. (2008) não verificaram indução de fitoalexinas em cotilédones de soja para os extratos orgânicos diclorometânico, hexânico e etanólico de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*, mas foi registrado atividade indutora para a síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

3.3.3 Eliciadores

Inicialmente os eliciadores eram definidos como sendo indutores da síntese de fitoalexinas em tecidos vegetais, no entanto, estes passaram a ser designados como moléculas capazes de induzir qualquer resposta de defesa em plantas, seja celular, como resposta de hipersensibilidade (HR) e/ou molecular, como a ativação transcricional de genes de defesa (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994). Para tanto os eliciadores passaram a ser utilizados como compostos ou tratamentos capazes de alterar rotas metabólicas e influenciar na síntese de moléculas (XU et al., 2008).

Kamoun (2006) define ainda eliciadores como sendo moléculas de agentes patogênicos que disparam respostas de defesa nas plantas, e como resultado, aumentam a resistência da mesma a patógenos invasores. Bonaldo et al. (2004) afirmam ainda que suas funções são determinadas por várias características estruturais, além de exibirem uma ampla

natureza química, a qual Resende et al. (2007) as definem como sendo moléculas capazes de induzirem a produção de fitoalexinas e de várias proteínas RP.

Zanardo, Pascholati e Fialho (2009) complementam que o aumento da capacidade da planta em expressar suas respostas de defesa contra agentes patogênicos consiste do tratamento com eliciadores. Estes por sua vez podem ser classificados como (PITTA-ALVAREZ; SPOLLANSKY; GIULIETTI, 2000; PASCHOLATI, 2011) abióticos que incluem luz ultravioleta, metal pesado (HgCl_2), que são agentes induzem estresse nas plantas, (MÉTRAUX, 2007) íons metálicos, moléculas orgânicas como acibenzolar-S-metil (ASM), (RESENDE et al., 2007) temperatura, ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno.

Em relação aos agentes bióticos, estes são classificados como organismos vivos, parte desses, ou mesmo seus metabólitos (DI PIERO; GARCIA JUNIOR; TONUCCI, 2005; BECKERS; CONRATH, 2007). Os eliciadores bióticos endógenos são de origem vegetal, que são moléculas liberadas pela própria planta tal como oligogalacturonídeos e outros oligômeros da parede celular (PASCHOLATI, 2011).

Em relação aos eliciadores de origem microbiana, estes são conhecidos como exógenos, produzidos ou liberados pelos patógenos, sendo fragmentos de parede celular que pertencem a diferentes classes químicas como, polímeros de carboidratos, glicoproteínas, oligopeptídeos, lipopolissacarídeos peptídeos, proteínas, lipídios e ácidos graxos (WALTERS; NEWTON; LYON, 2005; PASCHOLATI, 2011). Esses eliciadores podem ainda ser classificados quanto ao nível de especificidade. Os eliciadores gerais ou inespecíficos desencadeiam respostas de defesa em plantas hospedeiras e não hospedeiras, ao passo que os específicos são codificados por genes de avirulência de patógenos (*Avr*), que por sua vez induzem respostas apenas em cultivares de plantas que contêm o gene (*R*) de resistência a doença (MONTESANO; BRADER; PALVA, 2003; RESENDE et al., 2007).

Alamino et al. (2013) ressaltam sobre a relevância do avanço nas pesquisas com o emprego de eliciadores na ativação dos genes de defesa em plantas. Para Durrant e Dong (2004) e Jalali, Bhargava, Kamble (2006) ao serem reconhecidos pelos receptores, os eliciadores desencadeiam respostas de defesa nas células das plantas que levam a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos) glicoproteína rica em hidroxiprolina, ativação de mensageiros secundários (ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno) que atuam como sinalizadores para a expressão de proteínas-RP, (GRANT; LAMB, 2006) abertura de canais de íons, ativação de quinases no citoplasma, acidificação do citoplasma, alteração nos níveis de cálcio do citoplasma, cascata de sinalização via MAP-

quinases, deposição de calose e lignificação de tecidos como reforços da parede celular, e resposta de hipersensibilidade. Outro mecanismo ativado pelos eliciadores é a geração de espécies ativas de oxigênio (ERO), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), as quais causam danos irreparáveis (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; MARCHESE et al., 2008).

Os eliciadores estimulam os mecanismos de defesa da planta, de modo que na presença do patógeno as respostas a esta condição são mais rápidas e intensas, pois o reconhecimento do eliciador culmina em uma completa cascata de sinalizações que ativam o sistema de defesa do vegetal (LATIF et al., 2014). A literatura sugere que muitos dos eliciadores estudados tem um amplo espectro de indução de resistência de longa duração, embora existam aqueles de efeito temporário (WALTERS et al., 2005), característica esta que irá depender da relação entre planta, patógeno e ambiente (LATIF et al., 2014).

Durante o processo de evolução as plantas desenvolveram mecanismos capazes de reconhecer os sinais que indicam a presença de um microrganismo (GASSMANN; BHATTACHARJEE, 2012). Neste processo de reconhecimento estão envolvidos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a microrganismos (MAMPs) (NEWMAN et al., 2013). Os PAMPs ou MAMPs são moléculas que pertencem a diferentes classes e atuam como moléculas eliciadoras de defesa vegetal (MITHÖFER; BOLAND, 2008). O reconhecimento destas moléculas ocorre por receptores presentes na membrana celular ou no interior da célula, sendo estas proteínas transmembranas (HOGENHOUT et al., 2009; BECK et al., 2012).

O metabolismo da planta hospedeira pode passar por rápidas e transitórias alterações quando os PAMPs são reconhecidos por seus receptores, e a exemplo disso é verificado a ativação de cascatas de MAP quinases. Os autores ressaltam ainda, da necessidade de novos estudos sobre os padrões moleculares para melhor compreender como as plantas respondem durante o processo de infecção (CAVALCANTE et al., 2013). Alguns exemplos de PAMPs que exibem função na indução de defesa em plantas são β -glucanas, quitina, ergosterol (HE; SHAN; SHEEN, 2007), elicitin, xilanase, invertase, transglutaminase, flagelina, fucanas sulfatados, proteínas indutoras de necrose e glicoproteínas (NURNBERGER; LIPKA, 2005).

Em um outro processo de reconhecimento estão envolvidas as moléculas efetoras, definidas como sendo moléculas liberadas ou associadas a um organismo que modificam a fisiologia de outro organismo (KAMOUN, 2006). Arelado a evolução dos mecanismos de defesa das plantas os patógenos também desenvolveram estratégias de ataque, como a secreção de proteínas capazes de suprimir respostas de defesa vegetal, e como resultado, resultar em

suscetibilidade da planta desencadeada por efetores (BIRCH et al., 2008; ZHANG et al., 2010). Com o avanço de técnicas moleculares e sequenciamento foi possível elucidar muitas das estratégias de infecção dos patógenos, tal como as funções bioquímicas de moléculas efetoras de fungos, oomicetos, bactérias e nematoides, além dos mecanismos de defesa das plantas contra os mesmos (DALIO et al., 2014).

Baseado nesta interação constante entre planta-patógeno (COLL; EPPLÉ; DANGL, 2011) é que as plantas também evoluíram um mecanismo efetor como um sistema de defesa ao ataque de agentes patogênicos, por meio de proteínas R (CAVALCANTE et al., 2013) e que culminam na defesa da planta (OBWALD et al., 2014).

A literatura reporta alguns exemplos de eliciadores de grande relevância para estudos de indução dos mecanismos de resistência de plantas. Um exemplo disso é a proteína harpina, produzida por bactérias e utilizada nos dias atuais como eliciador comercial, com função de ativar a síntese de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, ácido jasmônico e o etileno (CLARKE et al., 2005). Alamino et al. (2013) se propuseram a estudar o efeito dos eliciadores acibenzolar-S-metil e proteína harpina na indução de resistência contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Os mesmos concluíram que ambos eliciadores proporcionaram redução da esporulação do patógeno e da lesão causada nos frutos de maçã, bem como o aumento da atividade da enzima peroxidase.

Zanardo, Pascholati e Fialho (2009) relataram que a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* contém frações indutoras de resistência à *Colletotrichum lagenarium*, quando testadas em cotilédones de pepineiro. Os autores verificaram ainda, que a autoclavagem do extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* foi necessária para a extração de moléculas de caráter eliciador, uma vez que estas são termoestáveis. Ainda, por cromatografia de troca aniônica compostos com atividade eliciadora foram purificados. Peng et al. (2004) estudaram plântulas de pepino tratadas com extrato de pectinase, a partir do produto de fermentação de *Penicillium oxalicum*, tiveram aumento na atividade das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase relacionadas a defesa contra *Cladosporium cucumerinum*, doença conhecida como sarna em pepino.

A fim de aprimorar os sistemas de cultivo por estratégias alternativas e economicamente viáveis, além de minimizar o uso de insumos químicos no controle de *Phytophthora melonis* em plantas de pepino, Abkhoo e Sabbagh (2015) concluíram que o extrato comercial de *Ascophyllum nodosum* promoveu aumento na atividade das enzimas β -1,3 glucanase, peroxidase, polifenoloxidase, lipoxigenase, fenilalanina amônia-liase e sintase galactinol, e aumento no teor de fenóis totais e do nível de transcrição de genes de defesa. Os

autores complementam que o extrato de algas marinhas pode conter moléculas elicitoras que condiciona a planta a níveis ideais de resistência contra agentes patogênicos.

2.4 MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL E CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

O termo cromatografia surgiu das palavras gregas *chrom* (cor) e *grafe* (escrever) e foi estudado em 1906 pelo botânico Mikhail Semenovitch Tswett, considerado hoje, como pai da cromatografia. Embora tenha sido estudada anteriormente por outros pesquisados, a técnica ficou estagnada até a década de 30, quando foi redescoberta por Tswett. Com o avanço tecnológico e o potencial da técnica, a cromatografia se difundiu em várias áreas de estudo. Tswett contribuiu com o desenvolvimento do método ao descrever a separação de componentes de extratos de folhas, utilizando colunas de vidro preenchidas com carbonato de cálcio (fase estacionária) e o éter de petróleo como eluente (fase móvel) (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; COLLINS, 2006). Como resultado da purificação, Tswett observou bandas coloridas separadas ao longo da coluna, formados no adsorvente, e eluídos em velocidades diferentes, para assim ocorrer a separação dos componentes (ETTRE, 2003).

Posteriormente aos estudos de Tswett, em 1930, Kuhn e Lederer passaram a aperfeiçoar o método de cromatografia em coluna, pela separação e identificação de xantofilas da gema do ovo. A coluna empregada para o método apresentou como fase estacionária o carbonato de cálcio e como fase móvel o éter de petróleo. Paralelamente a estes trabalhos, outros foram desenvolvidos, sempre com o intuito de amplificar e melhorar as aplicações da técnica (COLLINS, 2006).

A técnica cromatográfica pode ser classificada por critérios de: 1) Classificação pela forma física do sistema cromatográfico: pode ser dividida em cromatografia de coluna ou planar; 2) Classificação pela fase móvel empregada: caracterizada pela cromatografia gasosa, supercrítica e a líquida. A cromatografia líquida pode ainda ser subdividida em a cromatografia líquida clássica (CLC), de modo que, a fase móvel é arrastada ao longo da coluna apenas pela força da gravidade, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde se utilizam fases estacionárias de partículas menores, e com auxílio de uma bomba de alta pressão a fase móvel é eluída; 3) Classificação pela fase estacionária utilizada: são utilizadas fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas; 4) Classificação pelo método de separação: destacam-se os métodos de adsorção, partição, troca iônica e exclusão molecular (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A cromatografia é considerada como uma ferramenta analítica baseada na separação de moléculas e que engloba um conjunto de métodos físico-químicos que visam purificar diferentes componentes de uma amostra (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A técnica de cromatografia se destaca por ser um método de análise de fácil separação, identificação e quantificação das diversas espécies químicas presentes nos componentes de uma mistura (COLLINS, 2006), que pode ser empregado na identificação de compostos, tal como a purificação de moléculas desejáveis e a separação daquelas indesejadas (COLTRO-RONCATO et al., 2015), com auxílio de padrões previamente existentes.

A cromatografia está entre as principais técnicas de análise e separação de substâncias, como fluídos biológicos, produtos naturais e sedimentos de rios, devido a sua eficiência na caracterização de moléculas e a capacidade de resolução das colunas (LANÇAS, 2009).

A separação dos componentes de uma mistura está fundamentada na sua migração, que envolve a interação destas com duas fases imiscíveis que estão em íntimo contato. A fase móvel pode ser uma solução de tampão fosfato, Tris, borato, citrato, entre outras, eluídas por uma coluna em fluxo contínuo, sendo monitorada por um detector de luz ultra-violeta (UV). Para a purificação de proteínas e ácidos nucleicos existe um comprimento de onda já definido, sendo 280 nm e 260 nm, respectivamente. A coluna preenchida por uma matriz sólida e porosa é chamada de fase estacionária, cujo papel é retardar a passagem dos componentes de uma mistura, resultando em diferentes velocidades de migração das moléculas carregadas pela fase móvel (COLLINS, 2006).

Inúmeros são os métodos de separação, e podem ser empregados de acordo com o objetivo da análise. No caso da cromatografia gasosa, esta é empregada na separação de componentes voláteis como álcoois, cetonas, aldeídos, ao passo que a cromatografia líquida é utilizada para purificar moléculas como proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e esteroides (SCOTT, 2003).

Dentro da cromatografia líquida destaca-se a cromatografia de troca iônica, que foi registrada na literatura, pela primeira vez, pelos químicos Way e Thompson em 1850, a partir de observações feitas sobre a capacidade do solo em remover íons de amônia e de potássio. A sua fase estacionária possui trocadores aniônicos, com sítios carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos, carregados negativamente e retendo cátions. As proteínas, bem como outras moléculas, se ligam aos trocadores de cátions e ânions de acordo com a sua afinidade. A variação das cargas dos polímeros que apresentam em sua estrutura ácido-base são dependentes do pH, o qual pode influenciar na separação de uma proteína pelas diferenças de afinidade entre os trocadores de íons. No processo de eluição, a fase móvel carrega

primeiramente as proteínas que tem baixa afinidade pelo trocador de íons, e o eluato é obtido primeiro, ao contrário das proteínas de maior afinidade em que sua separação é retardada pela interação com o trocador (fase estacionária). Por sua vez, as proteínas que ficaram adsorvidas à resina são eluídas através de um gradiente contínuo de concentração de sal, melhorando a purificação das proteínas (SPADARO, 2006).

A cromatografia de filtração em gel, chamada também de exclusão molecular, separa as moléculas de acordo com o seu volume hidrodinâmico e massa molar. A fase estacionária se caracteriza por ser inerte e apresenta características que definem a distribuição e a velocidade de separação das substâncias. A matriz (fase estacionária), por onde a fase móvel é eluída, é formada de poros que interagem com a distribuição das partículas, pois aquelas de maior tamanho migram com velocidade superior e são separadas primeiro, ao ser comparada às de menor tamanho. Isso ocorre porque as moléculas de menor massa molecular penetram nos poros e percorrem um caminho maior pela fase estacionária, de maneira que moléculas de maior massa levam um tempo maior para ser detectada pela UV. Cabe ressaltar que o princípio da purificação é obter uma resolução de qualidade, e assim, estimar a massa molecular da partícula pela sua posição registrada no cromatograma (ROTHSCHILD, 2006).

Dada sua importância, vários são os trabalhos reportados na literatura, cujo método empregado na purificação de molécula foi a cromatografia. Meinerz et al. (2014) purificaram e selecionaram frações de extrato bruto de folhas da planta *Adiantum capillus-veneris*, por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel, e verificaram a capacidade das mesmas na síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. Gonçalves et al. (2014) testaram a metodologia de purificação de moléculas de caráter eliciador, a partir de fêmeas de nematoides fitopatogênicos por cromatografia de filtração em gel.

Moreira et al. (2008) purificaram frações de extratos alcoólicos de citronela por cromatografia de filtração em gel e por cromatografia de camada delgada, e testaram a indução de fitoalexinas em sorgo e soja e a atividade antifúngica sobre *Colletotrichum lagenarium*. Di Piero, Wulff e Pascholati (2006) utilizaram cromatografia de troca iônica para obter frações do fungo shiitake (*Lentinula edodes*) e avaliaram a atividade de peroxidase no controle de *Colletotrichum lagenarium* em mudas de pepino. Bonaldo e Pascholati (2007) purificaram frações de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliaram sua influência na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*.

Outros trabalhos com cromatografia se referem aos de Temporal (2014), na caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus*; Franzener (2011) com a purificação de frações a partir do extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora* por cromatografia de

troca iônica e filtração em gel; Iurkiv (2009) que avaliou a purificação parcial de compostos a partir *Pycnoporus sanguineus* por cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular; e Simões et al. (2005) que purificaram moléculas eliciadoras a partir de esporos de *Mucor ramosissimus* por cromatografia de troca iônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE NEMATOIDES (*Meloidogyne javanica* E *Meloidogyne incognita*)

As populações de *M. incognita* e *M. javanica* utilizadas foram obtidas de plantas de tomateiro cv. ‘Santa Clara’ proveniente de uma propriedade rural localizada no Município de Marechal Cândido Rondon, e identificadas com base na configuração perineal (HARTMAN; SASSER, 1985). A manutenção do inóculo foi feita em vasos plásticos com capacidade de 5 L contendo uma mistura de solo e areia durante o período de 2013 e 2015 no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mário César Lopes, pertence a Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, *campus* Marechal Cândido Rondon, Paraná.

3.2 EXTRAÇÃO DE FÊMEAS DE NEMATOIDES FORMADORES DE GALHAS

As raízes das plantas contendo galhas foram coletadas e a partir destas, com auxílio de uma agulha, 500 fêmeas individuais, de cada espécie de nematoide, foram extraídas e selecionadas no Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Marechal Cândido Rondon, Paraná. Após a separação das mesmas, estas foram maceradas em 200 µL de tampão Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,8 em tubo para microcentrífuga com auxílio de um bastão de vidro. Após, o volume da amostra foi completado para 1 mL com o mesmo tampão. Posteriormente, o macerado foi filtrado em filtros de seringa (Millipore) com 0,45 µm de diâmetro e o volume da amostra foi ajustado para 2 mL com o mesmo tampão.

3.3 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (CTI)

3.3.1 Purificação de Elicidores, a Partir de Nematoides Fitopatogênicos *M. incognita* e *M. javanica*, Através de Cromatografia de Troca Iônica (CTI)

A cromatografia de troca iônica (CTI) foi realizada em coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) (fase estacionária), e equilibrada com o tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 7,5) (fase líquida) e o processo foi conduzido em temperatura ambiente.

Uma amostra de 1,5 mL da preparação foi aplicada e eluída com o tampão de equilíbrio, com fluxo de 1,5 mL min⁻¹, sendo coletadas frações de 6 mL. Após a saída do material não adsorvido, o material retido foi deslocado por gradiente linear de NaCl, no tampão de equilíbrio, nas concentrações subsequentes de 0 a 100%, sendo que a determinação foi medida pela condutividade elétrica das frações eluídas em gradiente salino. O monitoramento das frações proteicas foi detectado em espectrofotômetro a 280 nm, e a de carboidratos foi determinado segundo o método descrito por Lever (1972). As frações foram reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e de carboidratos.

Para eliminação do NaCl, as frações foram dialisadas em membrana de limite de exclusão molecular de 12-16 kDa contra polietilenoglicol (PEG) 20.000 em água destilada em um volume de 4 L a 4 °C, com 6 horas de intervalo entre as trocas de água (três trocas) (FRANZENER, 2011). As frações eluídas somente em tampão Tris-HCl também foram concentradas nas membranas de diálise. As alíquotas das frações obtidas foram ajustadas para um volume final de 3 mL com tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8). O tampão de equilíbrio sempre foi deaerado por bomba de vácuo antes de ser eluído pela coluna.

Deste perfil de eluição foram obtidas um total de 12 frações para *M. javanica* e 14 frações para *M. incognita*, que foram testadas quanto à capacidade de induzir as fitoalexinas gliceolina e faseolina, em cotilédones de soja e hipocótilos de feijoeiro, respectivamente.

3.4 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL (CFG)

3.4.1 Metodologia de Calibração da Coluna de Filtração em Gel

Para a calibração da coluna utilizou-se Blue Dextrana (2000 kDa) para determinar o *void volume* (*V*₀): 5 mg dissolvido em 2 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8) (tampão de equilíbrio). O grupo de proteínas padrão utilizado foi: tireoglobulina (670 kDa), globulina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa), solubilizadas em 500 µL de tampão Tris-HCl. Cerca de 250 µL deste homogeneizado, mais 1.250 µL de água destilada foram aplicadas sobre o leito da coluna e eluída com tampão de equilíbrio. A cromatografia das proteínas calibrantes foi realizada nas mesmas condições que a cromatografia das proteínas (mesmo fluxo, absorção ótica, tampão e coluna), conforme descrito a seguir.

3.4.2 Purificação De Elicidores, a Partir De Fêmeas De Nematoides Fitopatogênicos *M. incognita* e *M. javanica*, Pela Cromatografia De Filtração Em Gel (CFG)

A cromatografia de filtração em gel (CFG) foi realizada em coluna uma coluna de vidro (1,5 cm x 50,0 cm) preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma Aldrich), formando um gel sedimentado (fase estacionária). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8) (fase móvel). Aplicou-se 1,5 mL das frações reunidas da CTI sobre o leito da coluna, e eluiu-se com o tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8), sendo coletadas frações de 1 mL, num fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O monitoramento das frações proteicas foi detectado em espectrofotômetro a 280 nm, e a de carboidratos foi determinado segundo o método descrito por Lever (1972). As frações foram reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e de carboidratos. Os picos de frações obtidos de *M. javanica* foram 63 e de *M. incognita* foram 58, sendo testados quanto à capacidade de induzir fitoalexinas gliceolina e faseolina, em cotilédones de soja e hipocótilos de feijoeiro, respectivamente.

A massa molecular relativa de cada fração detectada foi estimada por uma curva de calibração. Para proteína a curva foi construída plotando-se em um gráfico o log das massas moleculares das proteínas e o quociente do volume de eluição dessas proteínas pelo “void volume” (Ve/Vo) ($y = 8867,4e^{-3,231x}$) (Figura 1). A curva padrão de açúcares redutores (glicose) foi obtida pelo método de Lever (1972) ($y = 0,0414x - 0,0297$) (Figura 2).

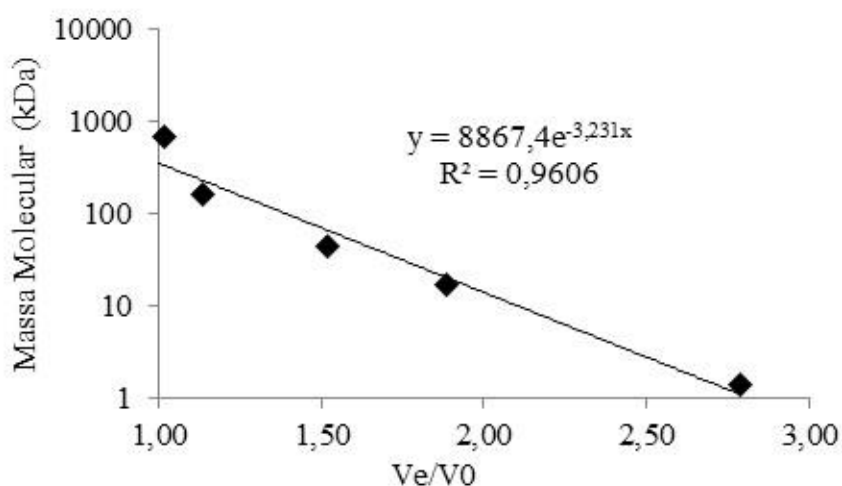


Figura 1 - Curva padrão para a determinação de massa molecular em coluna de filtração em gel (1,5 cm x 50,0 cm) de Sephacryl S-100-HR. Padrões moleculares: tireoglobulina (670 kDa), globulina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa). O volume vazio (Vo) da coluna foi determinado com azul de dextrana. Amostra de 1,5 mL eluídas em Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8. Frações coletadas de 1 mL, a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

3.5 AÇÚCARES REDUTORES

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado pelo método de Lever (1972). A reação envolveu a adição de 500 µL da amostra mais 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) 0,5% (0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico diluída em 10 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 40 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida em banho maria a 100°C durante 5 min e resfriada em banho de gelo. Para a calibração da amostra utilizou-se 500 µL do tampão Tris HCl 0,05 M (pH: 6,8) mais 1,5 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico. A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm, em espectrofotômetro, descontando-se os valores de absorbância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se curva-padrão de concentrações de glicose, sendo: ($y = 0,0414x - 0,0297$) (Figura 2).

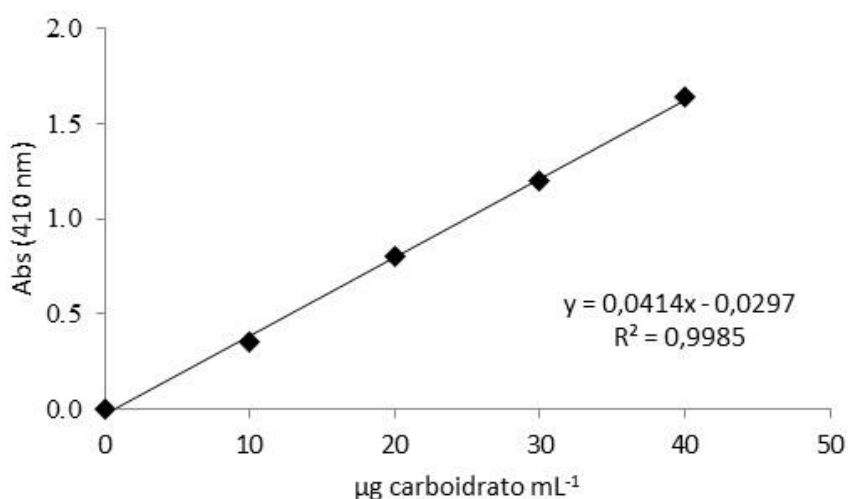


Figura 2 - Curva padrão para a dosagem de carboidratos redutores através do método de Lever (1972).

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A metodologia de Bradford (1976) foi empregada para a quantificação do conteúdo total de proteínas. Deste modo, foram homogeneizados 750 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8), 50 µL da amostra de fêmeas de nematoide e 200 µL de reagente de Bradford. O reagente de Bradford foi preparado em um balão volumétrico adicionando-se 250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de etanol P.A, 250 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) e completado o volume com água destilada para 500 mL. Após adicionar o reagente sob agitação

e incubar por 5 min, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Cada amostra foi formada por três réplicas. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína com base em albumina de soro bovino ($y = 0,0434x + 0,0431$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (μg)) (Figura 3).

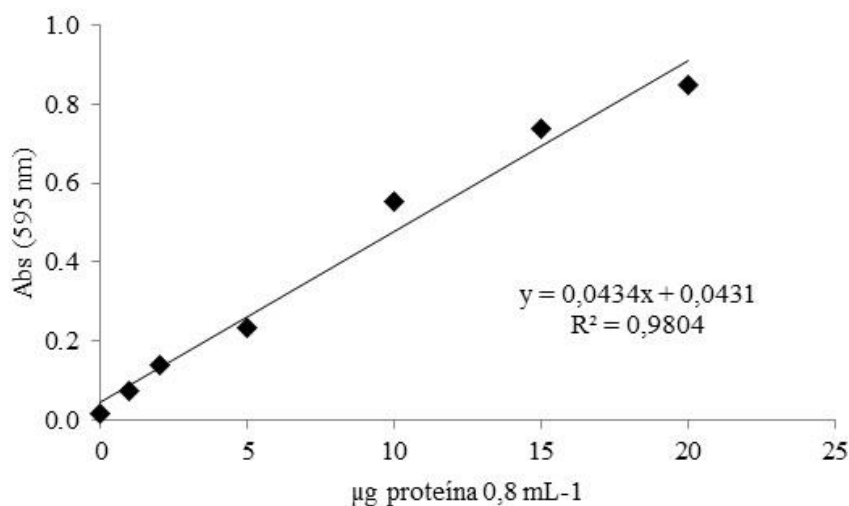


Figura 3 - Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976), utilizando reagente concentrado.

3.7 BIOENSAIO PARA PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS

3.7.1 Indução De Fitoalexinas Em Cotilédones De Soja

Sementes de soja (*Glycine max* L.), cultivar VMAX, foram sanitizadas em hipoclorito de sódio 1% (5 min), lavadas em água destilada e semeadas em bandejas plásticas contendo areia autoclavada (três vezes por 1 hora à temperatura de 121 °C e 1 atm). Após sete dias, os cotilédones, recém-abertos foram destacados para realização do bioensaio.

Os cotilédones destacados foram colocados em placas de Petri (cinco cotilédones/placa) contendo duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com 1 mL de água destilada esterilizada. Em cada cotilédone foi feita uma “cunha” na superfície adaxial, com o auxílio de um estilete e, em cada uma destas, foi adicionada uma alíquota de 20 μL dos tratamentos. As placas ficaram incubadas em estufa para BOD, à temperatura de 25 °C, no escuro, por 20 horas. Após esse período, os cotilédones incisados e tratados foram transferidos para frascos contendo 15 mL de água destilada esterilizada e deixados em agitação (agitador orbital/150 rpm) durante 1 hora, para extração da gliceolina. Em seguida, o sobrenadante foi

lido e a fitoalexina (gliceolina) foi mensurada em espectrofotômetro a 285 nm, e posteriormente os cotilédones foram lavados com água destilada, secos e pesados em balança analítica. O teor de gliceolina na amostra foi obtido pelo valor de absorbância dividido pela massa dos cotilédones (ABS/gmf⁻¹). Como tratamento controle foi utilizada a solução tampão Tris-HCl 0,05 M e como tratamento padrão de indução foi utilizado a suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* (20 mg mL⁻¹ produto comercial Fermento Biológico Fresco Fleishmann) (MEINERZ et al., 2008).

3.7.2 Indução De Fitoalexinas Em Hipocótilos De Feijoeiro

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar IPR-Colibri foram sanitizadas em hipoclorito de sódio 1% por 5 min e lavadas em água destilada esterilizada, semeadas em bandejas plásticas contendo areia autoclavada (três vezes por uma 1 hora à temperatura de 121 °C e 1 atm) e mantidas no escuro. Após sete dias, segmentos de hipocótilos estiolados com 0,5 cm foram destacados das plântulas, lavados em água destilada e secos sobre papel filtro estéril. Quatro segmentos de hipocótilo de 0,5 cm foram colocados em tubo para microcentrífuga e imersos em 500 µL das frações purificadas. Os tubos foram mantidos a 25 °C no escuro por 48 horas. Os hipocótilos tratados foram transferidos para frascos contendo 4 mL de etanol 80%, mantidos a 4 °C, por 48 horas, e agitados (agitador orbital/150 rpm) por 1 hora para extração da faseolina. Em seguida, o sobrenadante foi lido e a fitoalexina (faseolina) foi mensurada em espectrofotômetro a 280 nm. Em seguida os hipocótilos foram lavados em água destilada, secos e pesados em balança analítica.

O teor de faseolina na amostra foi obtido pelo valor de absorbância dividido pela massa dos cotilédones (ABS/gmf⁻¹). Como tratamento controle foi utilizada a solução tampão Tris-HCl 0,05 M e como tratamento padrão de indução foi utilizado o indutor de defesa vegetal acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹) (Bion ®) (BAILEY; BURDEN, 1983).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE FITOALEXINA

Os ensaios de fitoalexinas foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, submetidos à análise de variância e aplicado teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). A homogeneidade das variâncias foi determinada pelo teste de Liliefors. A transformação de dados foi utilizada quando necessária. O programa utilizado para análise estatística foi o software Genes (CRUZ, 2006).

4. RESULTADOS

4.1. FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE FÊMEAS DE NEMATOIDE *Meloidogyne javanica*

A maioria dos picos para carboidratos purificados apresentaram pequena magnitude, porém, a presença de um pico de natureza glicídica de maior absorbância foi registrada (0,132 nm), sem coincidir com o pico proteico, que corresponde ao material retido na resina. Como a resina utilizada é de troca aniônica, os carboidratos que ficaram ligados nela apresentam carga líquida negativa, sendo necessário ser eluídas nas condições de NaCl. Para os demais picos proteicos que coincidiram com os glicídicos, estes foram considerados como sendo glicoproteicos (Figura 4).

A partir da purificação de moléculas de fêmeas de nematoides *M. javanica* por CTI, as frações que apresentaram caráter espectrofotométricos semelhantes foram reunidas em três frações de natureza glicoproteicas (4, 5, 6) e três de natureza glicídicas (frações: 1, 2, 3) para aquelas não ligadas à resina e que apresentam carga líquida positiva. Para as frações em que as moléculas se encontraram ligadas à resina (eluídas contra um gradiente de concentração de NaCl e, em seguida, dialisadas contra água destilada) foram registradas três frações de natureza glicoproteicas (10, 11, 12) e três de natureza glicídica (7, 8, 9) (FIGURA 4, TABELA 1).

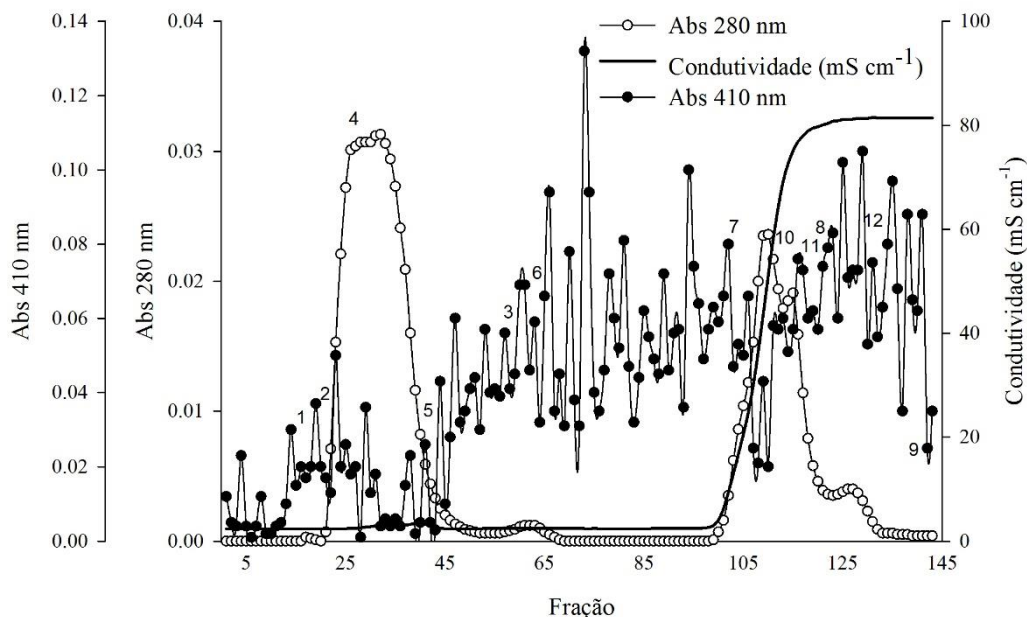


Figura 4 - Cromatografia de troca iônica a partir de amostras de fêmeas de nematoide *Meloidogyne javanica*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sobre a coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com Tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 7,5), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de 1,5 mL min⁻¹. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100%) no mesmo tampão. Proteína (○) foi determinada em 280 nm e carboidratos (●) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (-) foram determinadas indiretamente por condutividade.

4.1.2 Bioensaio De Fitoalexina Em Hipocótilos De Feijoeiro

As frações purificadas pela CTI a partir das fêmeas de *M. javanica* e testadas na produção da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro, são apresentadas na Tabela 1.

Para o teste Scott-Knott, as frações 1, 6 e 5 (não ligadas à resina) foram agrupadas no 1º grupo, os quais apresentaram carácter eliciador, com potencial ativador da fitoalexina faseolina, das quais, as concentrações de proteína total detectadas foram de 0,000 µg mL⁻¹, 0,412 µg mL⁻¹ e 0,343 µg mL⁻¹, respectivamente. Para teores de carboidratos as concentrações obtidas foram 1,249 µg mL⁻¹, 2,529 µg mL⁻¹ e 2,214 µg mL⁻¹, respectivamente. Ainda, para a fração 3, que respondeu de maneira similar ao ASM (acibenzolar-S-metil), os teores de proteína total e carboidratos foram de 0,000 µg mL⁻¹ e 0,838 µg mL⁻¹, respectivamente. Cabe ressaltar que para essas frações, assim como para as demais agrupadas em outros grupos, as

concentrações de carboidratos mostraram-se sempre maiores quando comparados aos de proteína total.

A quantidade de amostra utilizada para realizar a análise de proteína total foi de 50 µl, em função da quantidade disponível para a realização dos testes. Essa quantidade por sua vez, pode exercer influência na leitura e não representar a quantidade real de proteína presente na amostra.

As frações 1, 6 e 5 induziram a síntese de faseolina em 35,17%, 29,05% e 28,44%, respectivamente, maiores em relação ao tratamento padrão de indução ASM. Com relação a fração 3, esta proporcionou o mesmo nível de indução de faseolina que o tratamento padrão. Para as frações 7, 10, 4 e 2 não foi verificado influência na indução da fitoalexina, sendo esses valores semelhantes ao tratamento controle Tris HCl 0,05 M. Já, as frações 11, 8, 12 e 9 apresentaram efeito de supressão na indução da fitoalexina faseolina, com porcentagem de 28,06%, 37,00%, 40,68% e 45,95%, respectivamente, menor que o tratamento controle.

Tabela 1 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI), a partir de *Meloidogyne javanica*

Frações da CTI	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Faseolina (280 nm g.m.f^{-1})
1	Glicídica	0,000	1,249	17,68 A
6	Glicoproteica	0,412	2,529	16,88 A
5	Glicoproteica	0,343	2,214	16,80 A
3	Glicídica	0,000	0,838	15,01 B
7	Glicídica	0,000	1,683	11,83 C
10	Glicoproteica	0,786	1,852	11,32 C
4	Glicoproteica	0,878	1,877	10,90 C
2	Glicídica	0,000	1,128	10,73 C
11	Glicoproteica	0,117	1,732	7,64 D
8	Glicídica	0,000	0,789	6,69 D
12	Glicoproteica	0,343	2,456	6,30 D
9	Glicídica	0,000	1,828	5,74 D
ASM *	--	--	--	13,08 B
Tris HCl **	--	--	--	10,62 C
CV %				15

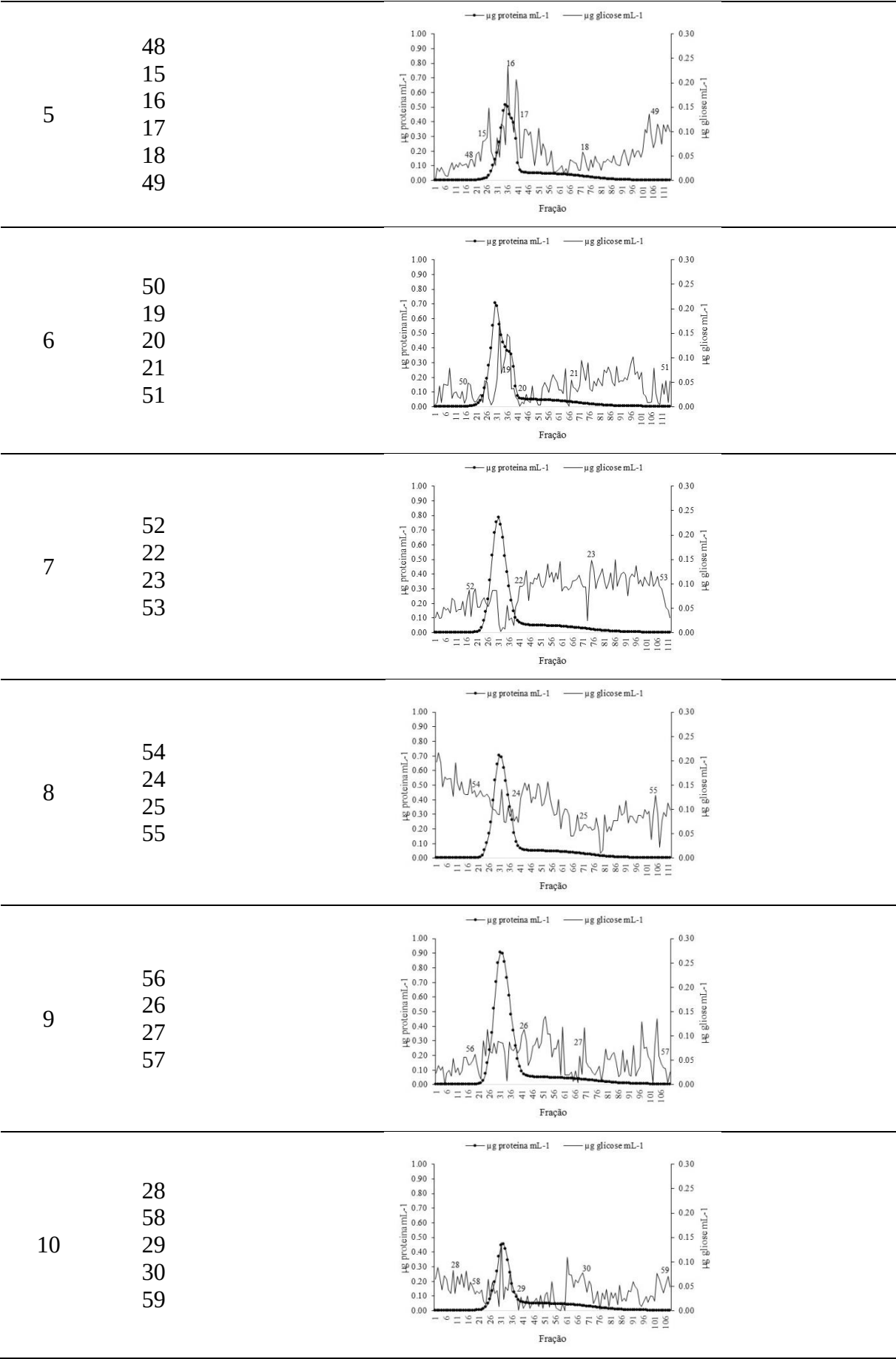
*Acibenzolar-S-metil (50mg i.a. L^{-1}), utilizado como tratamento padrão de indução; **Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); Teste Scott-Knott a 0,05 %.

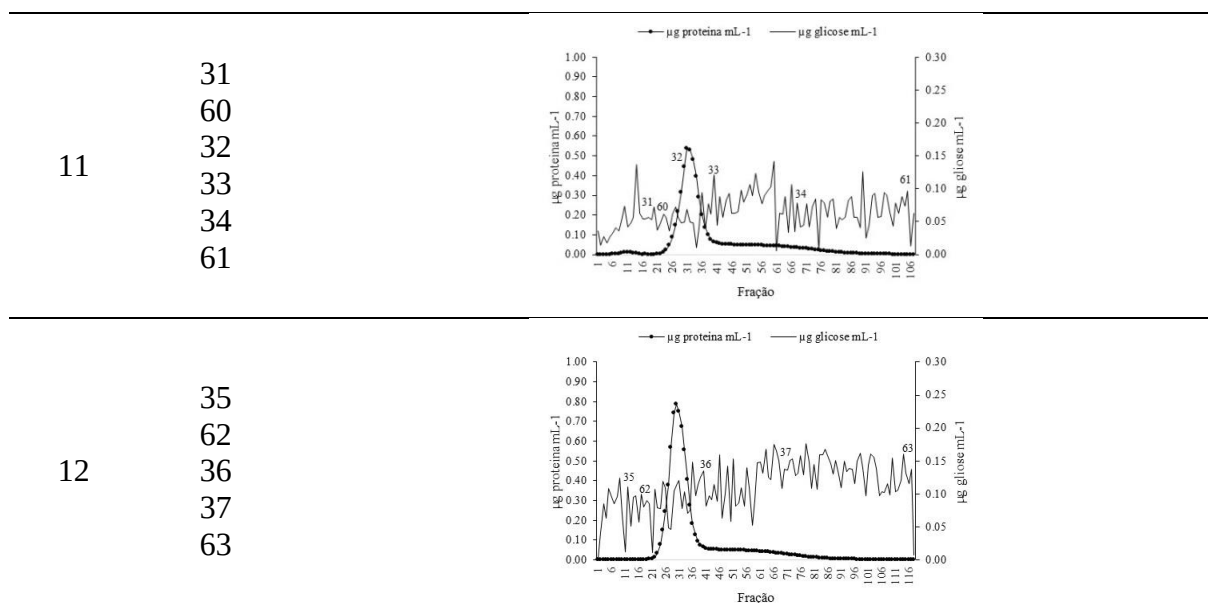
Na tentativa de purificar novas frações das fêmeas de *M. javanica*, com potencial indutor de fitoalexinas, aquelas obtidas pela CTI foram submetidas à CFG, e foi possível obter

picos diferentes. Nota-se que os perfis da CFG são representados na Tabela 2, cujo total de frações reunidas, de acordo com o perfil de eluição, totalizaram em 63 frações. O grupo de moléculas purificadas pela técnica apresentou natureza glicoproteica e glicídica, de massas moleculares conhecidas, que foram testadas em bioensaio de indução das fitoalexinas faseolina e gliceolina em feijoeiro e soja, respectivamente.

Tabela 2 - Cromatogramas de frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI) com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne javanica*

Frações CTI	Frações CFG	Profile
1	38	
	1	
	2	
	3	
	4	
	39	
2	40	
	5	
	6	
	7	
	8	
	41	
3	42	
	9	
	10	
	11	
	43	
	44	
4	46	
	12	
	13	
	14	
	47	





Perfil protéico (lido diretamente a 280 nm de absorvância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorvância) obtido por cromatografia de filtração em gel a partir das frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 da cromatografia de troca iônica.

A maioria das frações purificadas apresentou em sua composição maior concentração de carboidratos do que proteínas, exceto para as frações 17 ($10,873 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,326 \mu\text{g mL}^{-1}$), 33 ($7,102 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,085 \mu\text{g mL}^{-1}$), 20 ($4,848 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,930 \mu\text{g mL}^{-1}$), 26 ($6,833 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,374 \mu\text{g mL}^{-1}$), 36 ($4,614 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,423 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 5 ($2,793 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,674 \mu\text{g mL}^{-1}$) em que a concentração de proteínas foi maior em relação a de carboidratos, respectivamente, todas de natureza glicoproteica.

A utilização CFG foi eficiente para a purificação de compostos provenientes da CTI, com potencial para atividade sobre os hipocótilos de feijoeiro, embora nem todas as frações tenham apresentado essa mesma propriedade (Tabela 3). Pelo teste Scott-Knott as frações 6, 15, 17, 2 e 22 foram agrupadas no I grupo, e indicaram maior potencial de atividade indutora de faseolina, caracterizadas como sendo eliciadores de natureza glicoproteica, e com valores médios de 124,59%, 98,68%, 94,06%, 86,14% e 77,56%, respectivamente, maiores que o tratamento padrão de indução ASM. Estas frações correspondem às obtidas na CTI não adsorvidas na resina (carga positiva).

As frações 1 e 5 da CTI, que apresentaram atividade indutora de fitoalexina faseolina, quando foram submetidas à CFG resultaram nas frações 15, 17 e 2 capazes de induzir respostas de defesa nos hipocótilos de feijoeiro, com massas moleculares em torno de 329,31 kDa, 78,89 kDa e 107,62 kDa, respectivamente. Já as frações 2 (moléculas de carga líquida positiva) e 7 (moléculas de carga líquida negativa) purificadas pela CTI não apresentaram efeito indutor de

faseolina, porém quando submetidas a CFG resultaram nas frações 6 e 22 de caráter eliciador, com massas moleculares de 114,51 kDa e 188,25 kDa, respectivamente.

Com relação às frações 7 (natureza glicoproteica e massa molecular de 69,66 kDa) 56 (natureza glicídica) e 3 (natureza glicoproteica e massa molecular de 61,52 kDa) obtidas pela CFG, estas também apresentaram potencial de indução de faseolina, com 45,05%, 44,39% e 38,94%, respectivamente, comparado ao tratamento com ASM. A fração 7, que demonstrou potencial de indução, corresponde a fração 2 da CTI, cuja mesma não apresentou efeito indutor de faseolina, ao passo que, a fração 56 é correspondente a fração 9 (moléculas de carga líquida negativa) da CTI que teve efeito de supressão de fitoalexina. Ainda, a fração 3 obtida na CFG, corresponde a fração 1 (moléculas de carga líquida positiva) da CTI, da qual induziu a síntese de fitoalexina.

As frações 33, 20, 10, 27, 34, 16, 26, 29, 36, 55, 1, 54, 45, 24, 42, 40, 41, 21, 38 e 25 apresentaram o mesmo nível de indução de faseolina que o tratamento padrão ASM, de modo que, para as de natureza glicoproteica, as massas moleculares são conhecidas. As demais frações apresentadas não induziram fitoalexinas, sendo os valores semelhantes ao tratamento controle Tris HCl 0,05 M.

Tabela 3 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), massa molecular (kDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne javanica*

Frações da CFG	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Massa Molecular (kDa)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Faseolina (280 nmg.m.f^{-1})
6	Glicoproteica	1,142	114,51	3,229	13,61 A
15	Glicoproteica	0,159	329,31	3,882	12,04 A
17	Glicoproteica	10,873	78,89	3,326	11,76 A
2	Glicoproteica	0,505	107,62	2,626	11,28 A
22	Glicoproteica	3,869	188,25	4,220	10,76 A
7	Glicoproteica	1,280	69,66	3,471	8,79 B
56	Glicídica	0,000	--	3,471	8,75 B
3	Glicoproteica	0,067	61,52	2,457	8,42 B
33	Glicoproteica	7,102	166,25	3,085	7,44 C
20	Glicoproteica	4,848	101,13	3,930	6,69 C
10	Glicoproteica	0,820	57,81	4,002	6,44 C
27	Glicoproteica	0,659	37,42	4,147	6,41 C
34	Glicoproteica	0,159	54,33	3,519	6,21 C
16	Glicoproteica	1,392	114,51	3,664	6,19 C
26	Glicoproteica	6,833	176,91	3,374	6,13 C
29	Glicoproteica	0,113	176,91	3,302	5,94 C
36	Glicoproteica	4,614	213,16	3,423	5,93 C

55	Glicídica	0,000	--	2,940	5,84 C
1	Glicoproteica	0,243	156,24	2,698	5,69 C
54	Glicídica	0,000	--	3,205	5,58 C
45	Glicídica	0,000	--	3,278	5,55 C
24	Glicoproteica	1,964	176,91	3,205	5,52 C
42	Glicídica	0,000	--	3,060	5,43 C
40	Glicídica	0,000	--	2,795	5,39 C
41	Glicídica	0,000	--	2,867	5,30 C
21	Glicoproteica	0,947	47,98	2,988	5,27 C
38	Glicídica	0,000	--	3,109	5,26 C
25	Glicoproteica	0,059	47,98	3,471	5,24 C
46	Glicídica	0,000	--	2,795	5,21 D
49	Glicídica	0,000	--	2,360	5,21 D
39	Glicídica	0,000	--	3,205	5,09 D
8	Glicoproteica	0,455	42,37	4,002	5,02 D
37	Glicoproteica	0,059	54,33	3,616	4,99 D
12	Glicoproteica	0,021	107,62	3,036	4,99 D
47	Glicídica	0,000	--	3,616	4,99 D
4	Glicoproteica	0,044	33,04	4,002	4,95 D
52	Glicídica	0,000	--	2,964	4,95 D
31	Glicoproteica	0,417	2.123,97	3,640	4,87 D
61	Glicídica	0,000	--	0,790	4,85 D
30	Glicoproteica	0,113	54,33	3,036	4,85 D
35	Glicoproteica	0,466	2.989,25	4,002	4,81 D
13	Glicoproteica	0,021	89,31	3,616	4,75 D
53	Glicídica	0,000	--	2,529	4,73 D
59	Glicídica	0,000	--	2,481	4,70 D
18	Glicoproteica	0,521	42,37	3,688	4,68 D
50	Glicídica	0,000	--	2,577	4,65 D
57	Glicídica	0,000	--	3,930	4,61 D
44	Glicídica	0,000	--	2,981	4,59 D
5	Glicoproteica	2,793	188,25	2,674	4,57 D
32	Glicoproteica	0,348	188,25	3,254	4,55 D
28	Glicoproteica	0,267	2.723,24	2,988	4,49 D
14	Glicoproteica	0,036	42,37	3,809	4,45 D
63	Glicídica	0,000	--	1,200	4,42 D
23	Glicoproteica	0,924	42,37	3,205	4,40 D
51	Glicídica	0,000	--	2,601	4,31 D
19	Glicoproteica	0,735	200,32	3,688	4,29 D
60	Glicídica	0,000	--	2,360	4,22 D
11	Glicoproteica	0,498	29,19	2,263	4,18 D
62	Glicídica	0,000	--	1,635	4,17 D
48	Glicídica	0,000	--	2,432	4,16 D
58	Glicídica	0,000	--	2,312	4,07 D
43	Glicídica	0,000	--	3,713	4,07 D
9	Glicoproteica	0,659	121,86	3,785	3,96 D
ASM*	--	--	--	--	6,06 C
TrisHCl*	--	--	--	--	4,75 D
CV %					16

*Acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹), utilizado como tratamento padrão de indução; **Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); Teste Scott-Knott a 0,05 %.

4.1.3. Bioensaio De Fitoalexina Em Cotilédones De Soja

As frações purificadas pela cromatografia de troca iônica a partir das fêmeas de *M. javanica* e testadas na produção da fitoalexina gliceolina em cotilédone de soja, são apresentadas na Tabela 4.

Com base no teste Scott-Knott, a fração 12 (ligada à resina), de natureza glicoproteica, agrupada no 1º grupo, apresentou concentrações de proteína total e carboidrato em 0,343 µg mL⁻¹ e 2,456 µg mL⁻¹, respectivamente. Para as frações 8 e 9 (não ligadas à resina), ambas de natureza glicídica, foram agrupadas no 2º grupo, sendo os teores de proteína total de 0,0 µg mL⁻¹ e 0,0 µg mL⁻¹ e carboidratos 0,789 µg mL⁻¹ e 1,828 µg mL⁻¹, respectivamente. De maneira complementar para todas as frações testadas no ensaio de fitoalexina, as concentrações de carboidratos mostraram-se sempre maiores em relação aos valores de proteína total (Tabela 4).

O tratamento padrão de indução (*Saccharomyces cerevisiae*), reconhecido como indutor de fitoalexinas em soja (LABANCA, 2002), apresentou maior nível de indução de gliceolina. Para tanto, as frações 12, 8 e 9 também apresentaram efeito indutor da fitoalexina, porém com valores 17,39%, 56,52% e 60,87% respectivamente, menores que o tratamento padrão. Os teores de proteína total e carboidratos encontrados para a fração 8 foram de 0,000 µg mL⁻¹ e 0,789 µg mL⁻¹, respectivamente, e para a fração 9 foram de 0,000 µg mL⁻¹ e 1,828 µg mL⁻¹. Ainda, verifica-se que para ambas não foi registrado teor de proteínas totais, mas somente de carboidratos, provavelmente por serem de natureza glicídica. Com relação às frações 11, 5 e 4, não foi observado efeito indutor de gliceolina, sendo esses valores semelhantes ao tratamento controle Tris HCl 0,05 M. Para as frações 2, 7, 6, 10, 3, 1, estas suprimiram a indução da fitoalexina gliceolina em 39,28%, 58,93%, 62,50%, 96,43%, 96,43%, 98,21%, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

Tabela 4 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI), a partir de *Meloidogyne javanica*

Frações da CTI	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Gliceolina (285 nmg.m.f.^{-1})
12	Glicoproteica	0,343	2,456	0,19 B
8	Glicídica	0,000	0,789	0,10 B
9	Glicídica	0,000	1,828	0,09 B
11	Glicoproteica	0,117	1,732	0,06 C
5	Glicoproteica	0,343	2,214	0,06 C
4	Glicoproteica	0,878	1,877	0,06 C
2	Glicídica	0,000	1,128	0,03 D
7	Glicídica	0,000	1,683	0,02 D
6	Glicoproteica	0,412	2,529	0,02 D
10	Glicoproteica	0,786	1,852	0,02 D
3	Glicídica	0,000	0,838	0,02 D
1	Glicídica	0,000	1,249	0,01 D
Tris HCl*	--	--	--	0,56 C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	--	--	--	0,23 A
CV %				15

*Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); ** *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico Fresco Fleishmann) (20 mg mL^{-1}), utilizado como tratamento padrão de indução; Teste Scott-Knott a 0,05 %.

Em cotilédones de soja as frações da CFG também se mostraram eficientes, sendo que as frações 7, 17 e 26 foram inseridas no I grupo segundo o teste Scott-Knott, e apresentaram atividade de gliceolina superior ao tratamento padrão indutor *S. cerevisiae* em 421,05%, 410,53% e 289,47%, respectivamente (Tabela 5). As frações 7 e 17 apresentam massas moleculares de 69,66 kDa e 78,89 kDa e correspondem as frações 2 e 5 (não ligadas à resina da CTI), que não induziram a síntese da fitoalexina. Em relação à fração 26 de massa molecular de 176,91 kDa, esta corresponde a fração 9 da CTI, a qual se encontrava, inicialmente, ligada a resina de CTI. Os resultados indicam que para esta fração não houve perda de compostos eliciadores durante a fase de diálise pela membrana, já que o limite de exclusão molecular da mesma é de 12 a 16 kDa, o que normalmente por vir a ocorrer durante o procedimento de remoção do sal da amostra (Tabela 5).

Tabela 5 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), massa molecular (kDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne javanica*

Frações da CFG	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Massa Molecular (kDa)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Gliceolina (285 nm g.m.f.^{-1})
7	Glicoproteica	1,280	69,66	3,471	0,99 A
17	Glicoproteica	10,873	78,89	3,326	0,97 A
26	Glicoproteica	6,833	176,91	3,374	0,74 A
3	Glicoproteica	0,067	61,52	2,457	0,73 B
2	Glicoproteica	0,505	107,62	2,626	0,63 C
33	Glicoproteica	7,102	166,25	3,085	0,61 C
13	Glicoproteica	0,021	89,31	3,616	0,55 C
6	Glicoproteica	1,142	114,51	3,229	0,54 C
36	Glicoproteica	4,614	213,16	3,423	0,45 C
10	Glicoproteica	0,820	57,81	4,002	0,45 C
22	Glicoproteica	3,869	188,25	4,220	0,34 C
24	Glicoproteica	1,964	176,91	3,205	0,31 C
20	Glicoproteica	4,848	101,13	3,930	0,27 C
5	Glicoproteica	2,793	188,25	2,674	0,24 C
29	Glicoproteica	0,113	176,91	3,302	0,22 C
16	Glicoproteica	1,392	114,51	3,664	0,21 D
19	Glicoproteica	0,735	200,32	3,688	0,21 D
25	Glicoproteica	0,059	47,98	3,471	0,18 D
23	Glicoproteica	0,924	42,37	3,205	0,17 D
37	Glicoproteica	0,059	54,33	3,616	0,17 D
14	Glicoproteica	0,036	42,37	3,809	0,16 D
30	Glicoproteica	0,113	54,33	3,036	0,16 D
8	Glicoproteica	0,455	42,37	4,002	0,15 E
21	Glicoproteica	0,947	47,98	2,988	0,14 E
39	Glicídica	0,000	--	3,205	0,14 E
41	Glicídica	0,000	--	2,867	0,14 E
18	Glicoproteica	0,521	42,37	3,688	0,14 E
42	Glicídica	0,000	--	3,060	0,14 E
27	Glicoproteica	0,659	37,42	4,147	0,14 E
12	Glicoproteica	0,021	107,62	3,036	0,13 E
43	Glicídica	0,000	--	3,713	0,13 E
34	Glicoproteica	0,159	54,33	3,519	0,12 E
11	Glicoproteica	0,498	29,19	2,263	0,12 E
40	Glicídica	0,000	--	2,795	0,12 E
44	Glicídica	0,000	--	2,891	0,12 E
32	Glicoproteica	0,348	188,25	3,254	0,12 E
53	Glicídica	0,000	--	2,529	0,11 E
59	Glicídica	0,000	--	2,481	0,11 E
51	Glicídica	0,000	--	2,601	0,11 E
48	Glicídica	0,000	--	2,432	0,11 E
55	Glicídica	0,000	--	2,940	0,11 E

63	Glicídica	0,000	--	1,200	0,11 E
9	Glicoproteica	0,659	121,86	3,785	0,11 E
49	Glicídica	0,000	--	2,360	0,11 E
4	Glicoproteica	0,044	33,04	4,002	0,11 E
28	Glicoproteica	0,267	2.723,24	2,988	0,10 E
52	Glicídica	0,000	--	2,964	0,10 E
50	Glicídica	0,000	--	2,577	0,10 E
38	Glicídica	0,000	--	3,109	0,10 E
57	Glicídica	0,000	--	3,930	0,10 E
46	Glicídica	0,000	--	2,795	0,10 E
54	Glicídica	0,000	--	3,205	0,10 E
61	Glicídica	0,000	--	0,790	0,10 E
62	Glicídica	0,000	--	1,635	0,10 E
31	Glicoproteica	0,417	2.123,97	3,640	0,09 E
1	Glicoproteica	0,243	156,24	2,698	0,09 E
58	Glicídica	0,000	--	2,312	0,09 E
45	Glicídica	0,000	--	3,278	0,09 E
35	Glicoproteica	0,466	2.989,25	4,002	0,09 E
56	Glicídica	0,000	--	3,471	0,09 E
15	Glicoproteica	0,159	329,31	3,882	0,09 E
47	Glicídica	0,000	--	3,616	0,09 E
60	Glicídica	0,000	--	2,360	0,08 E
Tris HCl*	--	--	--	--	0,09 E
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	--	--	--	--	0,19 D
CV %					16

*Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); ** *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico Fresco Fleishmann) (20 mg mL⁻¹), utilizado como tratamento padrão de indução; Teste Scott-Knott a 0,05 %.

A fração 3, de natureza glicoproteica (61,52 kDa), agrupada no 2º grupo, também apresentou resposta indutora de gliceolina, com valor médio de 284,21% a mais em relação ao tratamento padrão com *S. cerevisiae*. A mesma corresponde a fração 1 da CTI, em que nesta não foi verificada atividade de indutora de fitoalexina, mas sim supressora (Tabela 4).

Em relação ao 3º grupo, encontram-se as frações (todas com suas respectivas massas moleculares): 2 (107,62 kDa), 33 (166,25 kDa), 13 (89,31 kDa), 6 (114,51 kDa), 36 (213,16 kDa), 10 (57,81 kDa), 22 (188,25 kDa), 24 (176,91 kDa), 20 (101,13 kDa), 5 (188,25 kDa) e 29 (176,91 kDa), que apresentaram atividade indutora de gliceolina, com 231,58%, 221,05%, 189,47%, 184,21%, 136,84%, 136,84%, 78,95%, 63,16%, 42,10%, 26,31% e 15,79%, respectivamente, maiores que o tratamento *S. cerevisiae*. As frações da CTI correspondentes a estas, estão apresentadas na Tabela 2. Cabe ressaltar, que as frações 36 e 37 da CFG resultaram em uma menor atividade de gliceolina ao serem comparadas a fração 12 obtida inicialmente pela CTI, que apresentou o mesmo nível de indução que o tratamento padrão. Desta maneira, a

resposta de defesa promovida após o processo de separação pela CFG resultou em frações de baixa eficiência na produção de gliceolina.

As frações 16, 19, 25, 23, 37, 14 e 30 proporcionaram o mesmo nível de indução de gliceolina que o tratamento padrão. De maneira complementar, todas as frações indutoras de fitoalexina mencionadas acima apresentam como característica natureza glicoproteica. Para as demais frações, agrupadas no 5º grupo, elas se mostraram ineficientes quanto a indução da síntese de fitoalexina em cotilédones de soja, sendo esses valores semelhantes ao tratamento controle Tris HCl 0,05 M (Tabela 5).

4.2. FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO NEMATOIDE *Meloidogyne incognita*

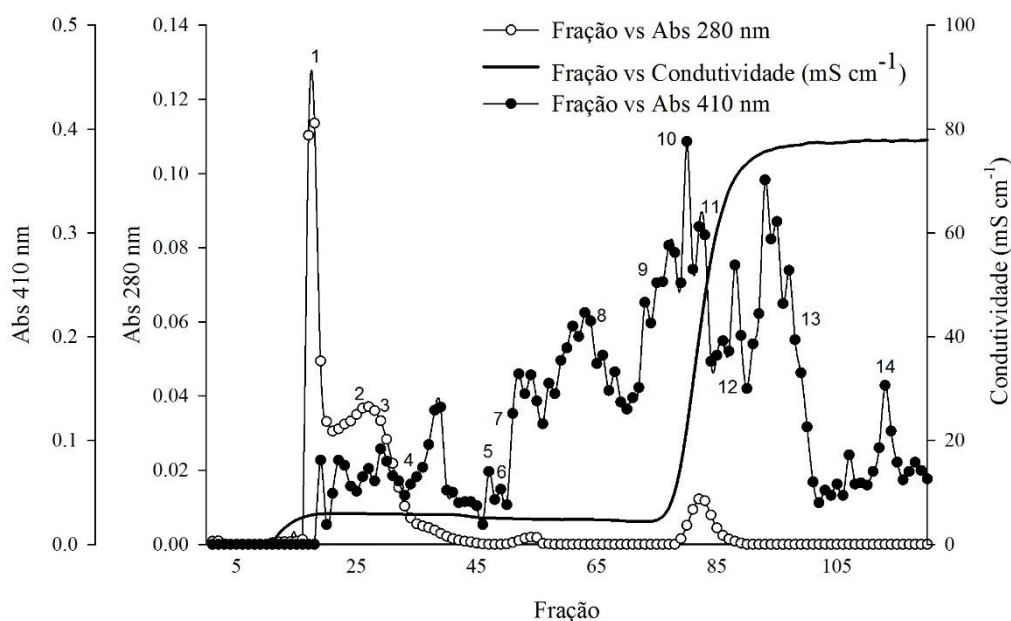


Figura 5 - Cromatografia de troca iônica a partir de amostras de fêmeas de nematoide *Meloidogyne incognita*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sobre a coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com Tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 7,5), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de 1,5 mLmin⁻¹. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100 %) no mesmo tampão. Proteína (○) foi determinada em 280 nm e carboidratos (●) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (-) foram determinadas indiretamente por condutividade.

A CTI, eluída com o tampão Tris HCl, permitiu obter um perfil com frações de caráter espectrofotométrico semelhantes. Em um primeiro momento, foram coletadas as frações não ligadas à resina, sendo quatro frações de natureza glicoproteica (1, 2, 3 e 4) e três frações de natureza glicídica (5, 6 e 7), logo, as mesmas apresentam carga líquida positiva. As frações que ficaram retidas à resina (eluídas contra um gradiente de concentração de NaCl e, em seguida, dialisadas contra água destilada) foram separadas em uma fração de natureza glicoproteica (10) e em seis frações glicídicas (8, 9, 11, 12, 13 e 14), caracterizadas como sendo moléculas de carga líquida negativa (Figura 5, Tabela 6). Assim, os picos proteicos coincidentes com picos de açúcares redutores são glicoproteínas.

4.2.1. Bioensaio De Fitoalexina Em Hipocótilos De Feijoeiro

As frações purificadas pela cromatografia de troca iônica a partir das fêmeas de *Meloidogyne incognita* e testadas na produção da fitoalexina faseolina, em hipocótilos de feijoeiro, são apresentadas na Tabela 6.

A fração 8 induziu a síntese de faseolina, com valor médio 93,77% maior que o tratamento padrão de indução ASM (acibenzolar-S-metil). Com relação às frações 13, 10 e 11 o efeito indutor de fitoalexina foi 51,44%, 40,25% e 34,66% maior em relação ao ASM, assim como para as frações 9, 14 e 12, que apresentaram o mesmo nível de indução de faseolina (25,24%, 22,20% e 15,17%) que o ASM.

Com relação às frações 5 e 7, não foi reportado indução da síntese de fitoalexinas nos hipocótilos de feijoeiro, sendo esses valores semelhantes ao tratamento controle (Tris HCl 0,05 M). As frações 2, 3, 4, 6 e 1 suprimiram a indução da fitoalexina faseolina, com valores 17,97%, 19,92%, 29,69%, 33,98% e 36,52%, respectivamente, menores que o tratamento controle.

Tabela 6 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI), a partir de *Meloidogyne incognita*

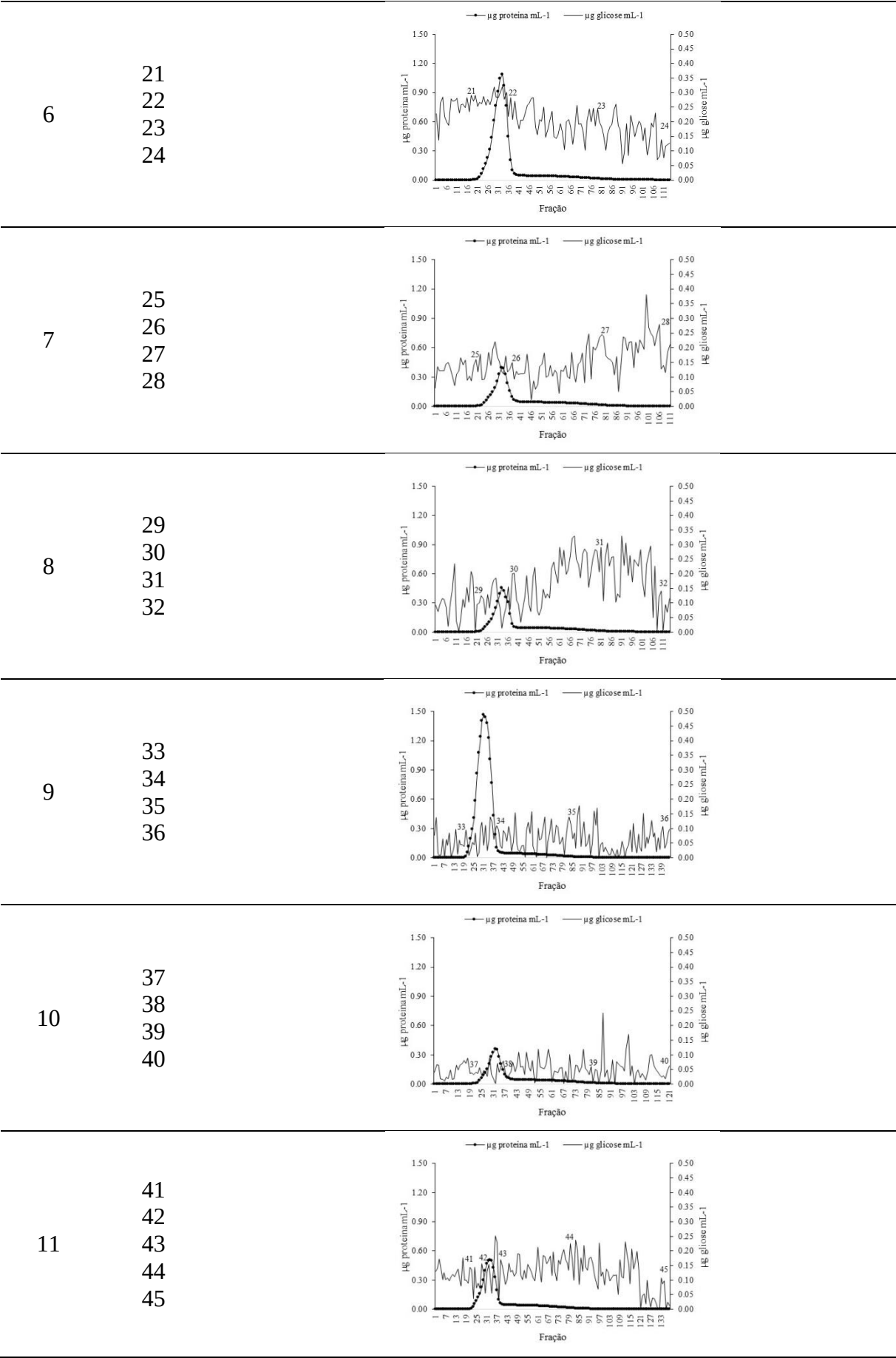
Frações da CTI	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Faseolina (280 nm g.m.f. ⁻¹)
8	Glicídica	0,000	1,249	12,13 A
13	Glicídica	0,000	0,886	9,48 B
10	Glicoproteica	0,624	0,789	8,78 B
11	Glicídica	0,000	1,611	8,43 B
9	Glicídica	0,000	1,877	7,84 C
14	Glicídica	0,000	1,369	7,65 C
12	Glicídica	0,000	1,128	7,21 C
5	Glicídica	0,000	0,862	5,03 D
7	Glicídica	0,000	1,079	4,74 D
2	Glicoproteica	0,555	1,200	4,20 E
3	Glicoproteica	0,279	0,838	4,10 E
4	Glicoproteica	0,302	0,959	3,60 E
6	Glicídica	0,000	0,862	3,38 E
1	Glicoproteica	0,624	1,079	3,25 E
Tris HCl*	--	--	--	5,12 D
ASM**	--	--	--	6,26 C
CV %				16

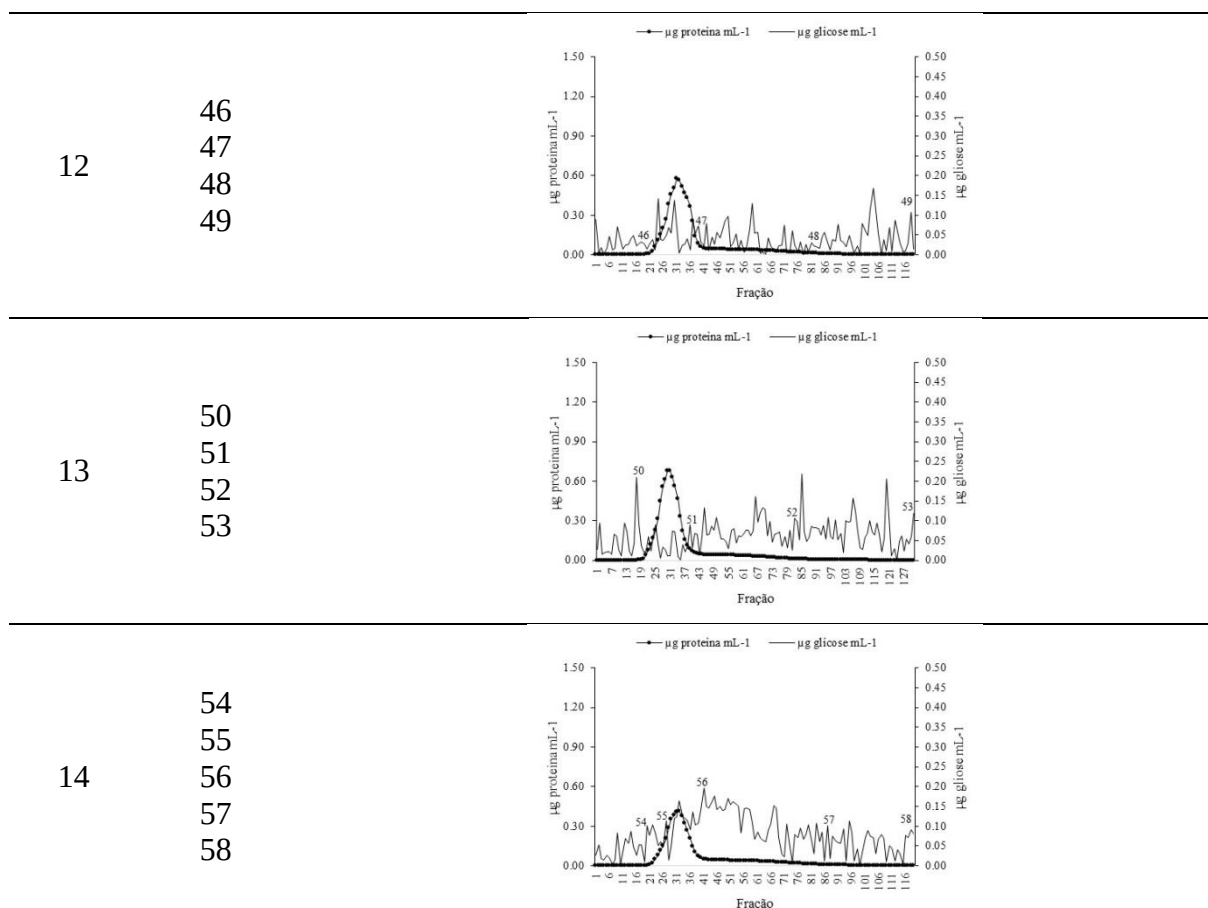
*Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); **Acibenzolar-S-metil (50 mg i.a. L⁻¹), utilizado como tratamento padrão de indução; Teste Scott-Knott a 0,05 %.

Com o intuito de purificar novas frações de caráter eliciador a partir de fêmeas de *M. incognita*, com atividade indutora de fitoalexinas, as frações obtidas pela CTI foram submetidas à CFG. Pelos perfis da cromatografia de filtração em gel (CFG) representados na Tabela 7, pode-se verificar a separação de 58 frações. O grupo de moléculas purificadas apresentaram natureza glicoproteica e glicídica, de massas moleculares conhecidas, as quais, foram testadas em bioensaios de indução das fitoalexinas faseolina e gliceolina em feijoeiro e soja, respectivamente.

Tabela 7 - Cromatograma de frações proteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI) com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne incognita*

Frações da CTI	Frações da CFG	Profile
1	1 2 3	
2	4 5 6 7 8	
3	9 10 11	
4	12 13 14 15	
5	16 17 18 19 20	





Perfil protéico (lido diretamente a 280 nm de absorvância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorvância) obtido por cromatografia de filtração em gel a partir das frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 da cromatografia de troca iônica.

As frações purificadas apresentaram em sua composição maior concentração de carboidratos do que proteínas, exceto as frações 56 ($4,114 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,167 \mu\text{g mL}^{-1}$), 13 ($11,987 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,949 \mu\text{g mL}^{-1}$), 51 ($3,800 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,553 \mu\text{g mL}^{-1}$), 17 ($9,214 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,031 \mu\text{g mL}^{-1}$), 10 ($9,076 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,302 \mu\text{g mL}^{-1}$), 34 ($14,929 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,176 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1 ($1,211 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,959 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 22 ($8,477 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,273 \mu\text{g mL}^{-1}$) em que a concentração de proteínas foi maior em relação a de carboidratos, respectivamente, todas de natureza glicoproteica.

Quando as frações da CTI foram submetidas à CFG, a purificação resultou em frações com diferentes características, como de indutoras, ou de baixa e/ou sem atividade de fitoalexina. Desta maneira, o tratamento padrão ASM demonstrou maior resposta de indução de faseolina em relação às demais frações testadas, não havendo, portanto, moléculas caracterizadas como eliciadores. As frações 56, 50, 19, 23, 58, 38, 57, 24, 29 e 13, agrupadas no 2º grupo, não apresentaram efeito indutor de fitoalexina, sendo os valores inferiores ao ASM. Com relação

às frações do 3º grupo, também não foi reportada indução da síntese de gliceolina, sendo esses valores semelhantes ao tratamento controle.

Para as frações agrupadas no 4º e 5º grupos, estas suprimiram a indução da fitoalexina nos hipocótilos de feijoeiro. As massas moleculares de cada fração são apresentadas na Tabela 8. Portanto, sugere-se que para esta condição estudada, a CFG não foi eficiente na separação de compostos, provenientes das frações de CTI, com atividade eliciadora de fitoalexina em feijoeiro.

Tabela 8 - Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), massa molecular (kDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne incognita*

Frações da CFG	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Massa Molecular (kDa)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Faseolina (280 nm g.m.f. ⁻¹)
56	Glicoproteica	4,114	176,91	2,167	8,29 B
50	Glicídica	0,000	--	3,737	8,11 B
19	Glicoproteica	0,028	42,37	2,650	7,92 B
23	Glicoproteica	0,059	61,52	2,650	7,81 B
58	Glicídica	0,000	--	2,167	7,70 B
38	Glicoproteica	0,205	156,24	1,514	7,44 B
57	Glicoproteica	0,090	47,98	2,094	7,14 B
24	Glicídica	0,000	--	1,370	7,04 B
29	Glicídica	0,000	--	2,601	6,99 B
13	Glicoproteica	11,987	146,83	1,949	6,81 B
54	Glicídica	0,000	--	5,065	6,28 C
4	Glicídica	0,000	--	0,838	6,16 C
40	Glicídica	0,000	--	4,341	6,15 C
16	Glicídica	0,000	--	2,167	6,13 C
8	Glicídica	0,000	--	2,167	6,00 C
48	Glicoproteica	0,059	47,98	3,254	5,94 C
26	Glicoproteica	0,551	156,24	2,650	5,93 C
27	Glicoproteica	0,067	61,52	1,587	5,87 C
49	Glicídica	0,000	--	4,486	5,78 C
44	Glicoproteica	0,082	54,33	2,553	5,77 C
51	Glicoproteica	3,800	200,32	2,553	5,75 C
53	Glicídica	0,000	--	4,944	5,72 C
17	Glicoproteica	9,214	121,86	1,031	5,71 C
9	Glicídica	0,000	--	2,940	5,60 C
37	Glicídica	0,000	--	2,070	5,55 C
28	Glicídica	0,000	--	1,490	5,44 C
10	Glicoproteica	9,076	137,98	3,302	5,38 C
47	Glicoproteica	1,733	188,25	2,601	5,34 C
39	Glicoproteica	0,167	54,33	3,930	5,32 C

34	Glicoproteica	14,929	188,25	1,176	5,32 C
11	Glicoproteica	0,036	42,37	1,708	5,32 C
52	Glicoproteica	0,059	42,37	3,085	5,07 D
3	Glicídica	0,000	--	1,780	5,06 D
36	Glicídica	0,000	--	3,254	4,72 D
30	Glicoproteica	0,604	146,83	3,339	4,69 D
12	Glicídica	0,000	--	1,853	4,67 D
7	Glicoproteica	0,182	37,42	1,128	4,66 D
5	Glicoproteica	0,044	156,24	3,036	4,59 D
15	Glicoproteica	0,075	61,52	1,684	4,32 D
20	Glicídica	0,000	--	1,611	4,13 E
41	Glicídica	0,000	--	4,365	4,09 E
2	Glicoproteica	0,013	69,66	1,345	4,08 E
1	Glicoproteica	1,211	200,32	0,959	4,06 E
33	Glicídica	0,000	--	2,650	4,06 E
46	Glicídica	0,000	--	2,722	3,87 E
25	Glicídica	0,000	--	1,635	3,85 E
32	Glicídica	0,000	--	3,302	3,67 E
35	Glicoproteica	0,228	54,33	3,254	3,62 E
42	Glicoproteica	0,044	176,91	2,722	3,58 E
45	Glicídica	0,000	--	2,722	3,50 E
22	Glicoproteica	8,477	146,83	1,273	3,44 E
21	Glicídica	0,000	--	1,080	3,37 E
31	Glicoproteica	0,090	61,52	2,650	3,09 E
Tris HCl*		--	--	--	5,18 C
ASM**		--	--	--	10,89 A
CV %					19

*Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); **Acibenzolar-S-metil (50mg i.a. L⁻¹), utilizado como tratamento padrão de indução; Teste Scott-Knott a 0,05 %.

4.2.2. Bioensaio De Fitoalexina Em Cotilédones De Soja

As frações purificadas pela cromatografia de troca iônica a partir das fêmeas de *M. incognita* e testadas na produção da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, são apresentadas na Tabela 9.

As frações 9, 8, 14 e 13 (ligadas à resina), todas de natureza glicídica, induziram a síntese de gliceolina, com valores 52,63%, 31,58%, 26,31% e 21,05% maiores em relação ao tratamento padrão de indução *S. cerevisiae*. Em relação às frações 11, 12 e 10 (ligadas à resina), 1 e 2 (não ligadas à resina), estas apresentaram o mesmo nível de indução de gliceolina (10,53%, 5,26%, 5,26%, 5,26% e 10,53%), respectivamente, comparado ao tratamento padrão. Para as frações 4, 7, 5, 3 e 6 não foi verificada influência na indução da fitoalexina, sendo esses valores semelhantes ao tratamento controle (Tris HCl 0,05 M).

Tabela 9 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica (CTI), a partir de *Meloidogyne incognita*

Frações da CTI	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Gliceolina (285 nm g.m.f.^{-1})
9	Glicídica	0,000	1,877	0,29 A
8	Glicídica	0,000	1,249	0,25 A
14	Glicídica	0,000	1,369	0,24 A
13	Glicídica	0,000	0,886	0,23 A
11	Glicídica	0,000	1,611	0,21 B
12	Glicídica	0,000	1,128	0,20 B
10	Glicoproteica	0,624	0,789	0,20 B
1	Glicoproteica	0,624	1,079	0,20 B
2	Glicoproteica	0,555	1,200	0,17 B
4	Glicoproteica	0,302	0,959	0,08 C
7	Glicídica	0,000	1,079	0,04 C
5	Glicídica	0,000	0,862	0,04 C
3	Glicoproteica	0,279	0,838	0,03 C
6	Glicídica	0,000	0,862	0,02 C
Tris HCl*	--	--	--	0,04 C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	--	--	--	0,19 B
CV %				27

*Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); ** *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico Fresco Fleishmann) (20 mg mL^{-1}), utilizado como tratamento padrão de indução; Teste Scott-Knott a 0,05 %.

As frações 18, 17 e 14 purificadas por CFG, com massas moleculares de 61,52 kDa, 121,86 kDa e 78,89 kDa, apresentaram o mesmo nível de indução de gliceolina que o tratamento padrão com *S. cerevisiae*. As frações 18 e 17 correspondem a fração 5, não ligadas a resina da CTI, que não apresentaram atividade indutora de gliceolina. O mesmo foi observado para a fração 14 da CFG, que é referente à fração 4 da CTI. Desta maneira, a CFG foi eficiente na separação de compostos provenientes das frações da CTI com características indutoras. Cabe ressaltar que, para estas frações, a concentração de carboidratos foi sempre maior que a de proteínas totais (Tabela 10).

Ao testar as frações 47 (188,25 kDa), 34 (188,25 kDa), 46 (--), 13 (146,83 kDa), 22 (146,83 kDa), 52 (42,37 kDa) e 10 (137,98 kDa), com suas respectivas massas moleculares conhecidas, verificou-se efeito indutor de fitoalexina, porém com valores inferiores as frações agrupadas no 1º grupo. Todas as frações apresentam natureza glicoproteica, exceto a fração 46 que é glicídica. As frações 13, 22 e 10 correspondem as frações 4, 6 e 3 da CTI, e que quando

testadas nos ensaios de fitoalexinas não foi verificado atividade das mesmas nos cotilédones de soja.

As frações, agrupadas no 4º grupo se mostraram ineficientes na indução da síntese de fitoalexina em cotilédones de soja, sendo esses valores semelhantes ao tratamento controle Tris HCl 0,05 M, enquanto que aquelas agrupadas no 5º grupo apresentaram efeito de supressão de indução da fitoalexina gliceolina.

Tabela 10 – Frações, natureza, teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), massa molecular (kDa), teor de carboidrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja (nm g.m.f.^{-1}), tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel (CFG), a partir de *Meloidogyne incognita*

Frações da CFG	Natureza	Teor de Proteína Total ($\mu\text{g proteína mL}^{-1}$)	Massa Molecular (kDa)	Teor de Carboidrato ($\mu\text{g glicose mL}^{-1}$)	Gliceolina (285 nm g.m.f.^{-1})
18	Glicoproteica	0,474	61,52	1,249	0,96 A
17	Glicoproteica	9,214	121,86	1,031	0,87 A
14	Glicoproteica	3,085	78,89	1,152	0,84 A
47	Glicoproteica	1,733	188,25	2,601	0,79 B
34	Glicoproteica	14,929	188,25	1,176	0,77 B
46	Glicídica	0,000	--	2,722	0,76 B
13	Glicoproteica	11,987	146,83	1,949	0,75 B
22	Glicoproteica	8,477	146,83	1,273	0,69 B
52	Glicoproteica	0,059	42,37	3,085	0,64 B
10	Glicoproteica	9,076	137,98	3,302	0,63 B
49	Glicídica	0,000	--	4,486	0,58 C
15	Glicoproteica	0,075	61,52	1,684	0,54 C
32	Glicídica	0,000	--	3,302	0,53 C
53	Glicídica	0,000	--	4,944	0,53 C
9	Glicídica	0,000	--	2,940	0,50 C
45	Glicídica	0,000	--	2,722	0,48 C
31	Glicoproteica	0,090	61,52	2,650	0,47 C
20	Glicídica	0,000	--	1,611	0,46 C
26	Glicoproteica	0,551	156,24	2,650	0,46 C
19	Glicoproteica	0,028	42,37	2,650	0,46 C
8	Glicídica	0,000	--	2,167	0,46 C
1	Glicoproteica	1,211	200,32	0,959	0,45 C
21	Glicídica	0,000	--	1,080	0,45 C
37	Glicídica	0,000	--	2,070	0,45 C
3	Glicídica	0,000	--	1,780	0,45 C
23	Glicoproteica	0,059	61,52	2,650	0,44 C
33	Glicídica	0,000	--	2,650	0,44C
50	Glicídica	0,000	--	3,737	0,44 C
24	Glicídica	0,000	--	1,370	0,44 C
2	Glicoproteica	0,013	69,66	1,345	0,44 C
4	Glicídica	0,000	--	0,838	0,44 C
35	Glicoproteica	0,228	54,33	3,254	0,43 C

54	Glicídica	0,000	--	5,065	0,41 C
12	Glicídica	0,000	--	1,853	0,41 C
51	Glicoproteica	3,800	200,32	2,553	0,41 C
56	Glicoproteica	4,114	176,91	2,167	0,39 D
6	Glicoproteica	0,013	89,31	1,176	0,39 D
41	Glicídica	0,000	--	4,365	0,39 D
30	Glicoproteica	0,604	146,83	3,399	0,38 D
44	Glicoproteica	0,082	54,33	2,553	0,37 D
7	Glicoproteica	0,182	37,42	1,128	0,37 D
5	Glicoproteica	0,044	156,24	3,036	0,37 D
55	Glicoproteica	0,067	226,83	1,104	0,37 D
48	Glicoproteica	0,059	47,98	3,254	0,36 D
38	Glicoproteica	0,205	156,24	1,514	0,36 D
36	Glicídica	0,000	--	3,254	0,36 D
43	Glicoproteica	8,247	137,98	2,891	0,35 D
27	Glicoproteica	0,067	61,52	1,587	0,35 D
40	Glicídica	0,000	--	4,341	0,33 D
39	Glicoproteica	0,167	54,33	3,930	0,33 D
29	Glicídica	0,000	--	2,601	0,31 D
57	Glicoproteica	0,090	47,98	2,094	0,31 D
28	Glicídica	0,000	--	1,490	0,31 D
25	Glicídica	0,000	--	1,635	0,30 D
11	Glicoproteica	0,036	42,37	1,708	0,30 D
42	Glicoproteica	0,044	176,91	2,722	0,29 D
58	Glicídica	0,000	--	2,167	0,29 D
16	Glicídica	0,000	--	2,167	0,29 D
Tris HCl*		--	--	--	0,58 C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **		--	--	--	0,98 A
CV %					24

*Solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia (tratamento controle); ** *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico Fresco Fleishmann) (20 mg mL⁻¹), utilizado como tratamento padrão de indução; Teste Scott-Knott a 0,05 %.

5. DISCUSSÃO

Em um primeiro momento, a utilização do método de cromatografia no desenvolvimento do presente trabalho foi baseada na rapidez, simplicidade, fácil manipulação, por ser menos dispendioso e pela eficiência em purificar moléculas, tal como, reportado por Collins (2006) e Camacho et al. (2012).

Entre os métodos empregados na purificação de moléculas a partir de microrganismos destaca-se a cromatografia, técnica utilizada no presente estudo que permitiu a separação de moléculas presentes em fêmeas de nematoides, moléculas estas com características relevantes para o estudo de mecanismos de resistência em plântulas de soja e feijoeiro.

As frações cromatográficas de *M. javanica* da CTI testadas em bioensaios com hipocótilos de feijoeiro apresentaram diferentes respostas no processo de indução de mecanismos de defesa vegetal, de maneira que foi observada a presença de moléculas eliciadoras, que resultaram no acúmulo de fitoalexina. Tal resultado está atrelado à atividade conjunta de moléculas a partir dos picos obtidos. Frações com atividade supressoras também foram encontradas. Para tanto, as frações referentes à CTI, quando submetidas à CFG, também foram eficientes e resultaram em componentes com atividade individual capazes de induzir fitoalexina em plântulas de feijoeiro.

Em relação ao bioensaio em cotilédones de soja, a partir das frações de CTI, não foi verificada a presença de moléculas eliciadoras capazes de induzir maior nível de fitoalexina que *S. cerevisiae*, tratamento utilizado como padrão de indução. Ainda foi relatada a presença de moléculas supressoras para a síntese de gliceolina. No entanto, quando submetidas à CFG, foram obtidas frações de carácter eliciador. Portanto, sugere-se a presença de moléculas com características diferenciadas, como indutoras e como supressoras, nas fêmeas de *M. javanica*, para a condição testada.

Para a espécie *M. incognita*, em hipocótilos de feijoeiro, a purificação inicial feita pela CTI resultou em frações com presença de moléculas eliciadoras, bem como supressoras. Entretanto, na CFG, nenhuma fração teve efeito como eliciadora, mas sim como supressora. Em relação a atividade indutora de gliceolina, em cotilédones de soja, frações eliciadoras foram purificadas da CTI, porém não foi constatada atividade eliciadora de frações purificadas na CFG com valores superiores ao tratamento padrão. Ainda, foi constatada a presença de frações supressoras da atividade da fitoalexina.

Segundo Smith (1996) os eliciadores são constituídos por uma ampla natureza química de moléculas, e por isso não existe uma única característica estrutural que possa definir a sua

atividade eliciadora, pois para Dixon e Lamb (1990) pode haver duas ou mais moléculas eliciadoras atuando juntas e simultaneamente.

Em um trabalho desenvolvido por Zanardo, Pascholati e Fialho (2009), frações do sobrenadante, obtido da precipitação etanólica do extrato bruto aquoso de *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram atividade indutora de resistência em cotilédones de pepineiro. A presença dessas frações, separadas por cromatografia de troca aniônica, demonstram a eficiência do método quanto ao processo de purificação de moléculas com atividade eliciadora para trabalhos com indução de resistência. Ainda de maneira complementar, os autores verificaram que as frações apresentaram maior concentração de carboidratos em relação ao de proteínas nas amostras purificadas. Estes resultados corroboram com os observados no presente estudo, em que a maioria das frações purificadas pela CTI e CFG apresentaram maior concentração de carboidratos do que proteínas.

A purificação e caracterização parcial de eliciadores de *Adiantum capillus-veneris* capazes de ativar a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo foi realizada pela técnica de CFG e relatado por Meinerz et al. (2014), que observaram que o método utilizado foi eficaz para selecionar frações com potencial para serem empregados em estudos de indução de resistência em plantas a doenças. Moreira et al. (2008) caracterizaram moléculas eliciadoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, presentes em frações de extratos metanólicos e etanólicos de citronela, por CFG.

Cabe ressaltar, que no presente trabalho, o método utilizado se mostrou válido. O fato de frações purificadas na CTI não terem efeito indutor de faseolina e gliceolina, mas que quando submetidas ao CFG assim o tiveram, indica que, provavelmente, para que estas moléculas sejam reconhecidas como eliciadores pela planta há a necessidade da atividade individual das mesmas. Para as frações da CTI que foram efetivas na indução de fitoalexina e quando purificadas na CFG não apresentaram a mesma resposta, acredita-se que há a necessidade das moléculas estarem atuando juntas para ocorrer este fenômeno. Sendo assim, as frações que são resultantes da CTI e as subsequentes separações destas por CFG, resultam em novas frações com características e com grupos de moléculas diferenciadas, tanto para proteínas quanto para carboidratos.

De maneira complementar, segundo a literatura, não há relatos sobre a obtenção de frações purificadas a partir de fêmeas de nematoides fitopatogênicos, mas as técnicas de cromatografia de troca iônica e exclusão molecular merecem destaque pela sua importância e relevância no que diz respeito as pesquisas que objetivam purificar e caracterizar moléculas a

partir de outros agentes, e assim estudar o seu potencial indutor de resistência em plantas a doenças.

Isso está relacionado com o fato de que as plantas reconhecem e reagem contra patógenos por meio da produção de radicais de O_2 , produção de barreiras estruturais e toxinas que bloqueiam a atividade do patógeno (JONES; DANGL, 2006). Essas respostas de defesa podem ser induzidas quando a planta reconhece padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs).

Os PAMPs são moléculas conservadas por patógenos que as utilizam para sua sobrevivência (GHEYSEN; JONES, 2013). De acordo com Hegeman et al. (2012), as proteínas presentes nas secreções dos nematoides são destinadas a proteger os mesmos de respostas de defesa do hospedeiro. A exemplo disso destaca-se a glutathione-S-transferase (GST) expressa nas glândulas da faringe de *M. incognita* (DUBREUIL et al., 2007). No entanto, os autores verificaram ainda, a atuação da GST na detoxificação de metabólitos secundários que a planta utiliza para impedir a invasão do patógeno.

Em *Globodera rostochiensis* foi identificada a peroxidase glutathione secretada e expressa em sua hipoderme, porém, também foi relatada sua produção em plantas, a qual pode estar relacionada com as vias de sinalização de defesa da planta (GHEYSEN; JONES, 2013).

Frente ao exposto, as frações purificadas no presente estudo e posteriormente testadas em ensaios de indução de fitoalexinas gliceolina e faseolina, demonstraram potencial indutor das mesmas em cotilédones de soja e hipocótilos de feijoeiro. A maioria das frações reunidas no presente trabalho apresentou natureza glicoproteica, ou seja, presença de proteínas e carboidratos nas frações. A informação corrobora com o descrito por Braga (2008) em que na maioria das moléculas eliciadores purificadas é encontrado o carboidrato fazendo-se presente como componente das frações purificadas, juntamente com as proteínas, formando assim os eliciadores de natureza glicoproteica.

A hipótese de existir eliciadores na composição da cutícula e na parede celular das fêmeas de nematoides, bem como a secreção de proteínas pelo J2 (juvenil de segundo estágio) foi baseada na capacidade das frações purificadas em induzir a síntese das fitoalexinas faseolina e gliceolina. Frente a isso, ao realizar a purificação parcial de frações a partir de fêmeas de nematoides de *M. javanica* e *M. incognita* pela técnica de CTI e seguida da CFG, o mecanismo de ação e o efeito destas frações na atividade indutora de fitoalexina em cotilédones de soja e hipocótilos de feijoeiro foi apontada nos bioensaios. De maneira complementar, existem eliciadores, glicoproteínas, na região anterior do nematóide, capazes de induzir a síntese de fitoalexinas (FARIA et al., 2003).

A resposta de defesa da planta a presença do nematoide é detectada dentro do citoplasma do sítio de alimentação, logo após a invasão do mesmo. Estas respostas de defesa evoluem a partir da necrose das células vizinhas (reação de hipersensibilidade) que buscam prevenir a formação de novos sítios de alimentação (FARIA et al., 2003). Além das respostas de hipersensibilidade verificadas como mecanismo de defesa, outras respostas são observadas como acúmulo de composto fenólicos, produção de fitoalexina, atividade da fenilalanina amonialiase (GIEBEL, 1982), acúmulo de peroxidase (IBRAIM, 1991) polifenoloxidase, quitinases (QIU et al., 1997).

Cabe mencionar ainda, que a importância da indução da síntese de fitoalexinas é que estas afetam as funções do nematoide, tal como a ruptura da plasmalema e das membranas vasculares, bem como a inibição da respiração mitocondrial. A mobilidade do nematoide também pode ser afetada (GIEBEL, 1973).

As características indutoras das frações purificadas podem estar atreladas às moléculas presentes nos nematoides, pois segundo Ferraz e Monteiro (2011), a cutícula que envolve a parede do corpo do nematoide é uma estrutura metabolicamente ativa e é composta basicamente por proteínas, sendo importantes para estudos de indução de resistência, visto que, ainda é desconhecida.

Ainda, os nematoides possuem glândulas esofagianas subventrais, as quais produzem proteínas que atuam na formação dos sítios de alimentação. Durante a fase de eclosão e no estágio J2 são encontradas essas glândulas com células altamente funcionais, e que desempenham papel fundamental no início do parasitismo dos nematoides nas plantas, o que por sua vez, também recebe atenção por atuarem na ativação de rotas de sinalização dos mecanismos de defesa vegetal (JONES et al., 2003). A importância de se conhecer essas proteínas presentes nos nematoides deve-se ao fato de que durante a fase de infecção, ao penetrar o estilete na célula vegetal, o nematoide injeta proteínas que culminam em alterações fisiológicas e morfológicas das células, e como resultado originam células gigantes que irão produzir mais proteínas para serem utilizadas na alimentação dos nematoides (MITKOWSKI; ABAWI, 2003).

Portanto, a presença destas proteínas que fazem parte da composição da cutícula, bem como nas glândulas de J2, ainda no interior dos ovos, a qual constituem as fêmeas, podem justificar o fato de que algumas das frações selecionadas no presente estudo apresentaram capacidade de induzir os cotilédones de soja e hipocótilos feijoeiro a produzirem fitoalexinas. Jones, Smant e Blok (2000) e Robertson et al. (2000) comentam que a cutícula dos nematoides é constituída basicamente por proteínas, a qual muitas de importância para o parasitismo, já

foram identificadas, e além disso são encontrados hidratos de carbono e lipídios compondo a estrutura da mesma.

Estas proteínas podem ou não resultar na indução dos mecanismos de defesa das plantas, pois para Temporal (2014) existem eliciadores específicos que ativam rotas ou vias de sinalização e, assim, induzem a expressão de genes específicos. Para Graham (1995) os eliciadores podem induzir os precursores do tecido vegetal a produzirem fitoalexinas, próximo ao local da infecção ou onde o tratamento foi aplicado.

A indução de genes associados à defesa de plantas a patógenos foi reportado por Manosalva et al. (2015), que em seu estudo objetivaram avaliar a percepção e as respostas de defesa das plantas quanto a presença de moléculas de sinalização, produzidas por nematoides parasitas de plantas. Essas moléculas, chamadas de ascarosides, são glicosídeos compostos que ao sofrerem hidrólise formam açúcares, e que segundo os autores, podem ser percebidos pelas plantas por receptores que ativam respostas de defesa a diversos patógenos.

De acordo com os resultados alcançados pelos mesmos autores dentro do gênero *Meloidogyne* spp., foi caracterizado em maior quantidade o ascaroside ASCR#18, composto com 11 carbonos de cadeia lateral, assim como para as espécies *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* que também revelaram a presença de ASCR #18, porém em menor número. Quando raízes de *Arabidopsis* foram tratadas com diferentes concentrações de ASCR #18, 24 horas antes das folhas serem inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. tomato e com o patógeno viral (Virus-TCV), verificou-se que na concentração 1 mM houve redução no crescimento dos patógenos, bem como no desenvolvimento dos sintomas da doença. Além disso, foi verificado que o nível de infecção de nematoides em raízes de *Arabidopsis* reduziu sob efeito direto de ASCR #18. Ainda, com o intuito de estudar as respostas de defesa e resistência em tomate, batata e cevada, por meio da percepção do ascaroside, foi observada a expressão de genes, ativação da proteína-quinase, assim como das rotas de sinalização ácido salicílico e ácido jasmônico. Sendo assim, os autores concluíram que ASCR #18 é percebido pelas plantas como sinal molecular capaz de induzir resistência em *Arabidopsis*, tomate, batata e cevada aos patógenos estudados.

Para o presente trabalho, no caso das frações em que não induziram fitoalexinas existe duas hipóteses em que os resultados podem estar baseados. A primeira esta relacionada com o volume de tratamento utilizado, pois Hahn (1996) sugere que o baixo rendimento das frações purificadas pode mascarar as respostas de defesa ou a ativação das rotas de sinalização.

Ainda, alguns trabalhos sugerem que a atividade eliciadora pode ser reduzida em função da diluição do tratamento, porém no presente estudo pode-se observar que a

concentração de proteínas e carboidratos geralmente foi maior para as frações provenientes da CFG quando comparado a CTI. De maneira complementar, Bonaldo et al. (2007) verificaram que a diluição do extrato bruto de eucalipto induziu a fitoalexina deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo. Bonaldo (2005) também observou que as diluições 10, 100, 1.000 e 10.000 vezes do preparado de *S. cerevisiae* induziram fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Ainda, deve-se considerar que durante o procedimento de diálise das frações eluídas em NaCl pode haver perdas de compostos pela membrana de diálise. Segundo Queiroz, Collins e Jardim (2001) os compostos de baixa massa molecular podem permear pela membrana e/ou sofrerem diluições. Baseado nessas informações, pode-se ressaltar também a possível ausência de capacidade eliciadora nessas moléculas purificadas

Uma segunda hipótese seria frações com a presença de supressores de fitoalexinas, pois para o presente trabalho, além de indutores também foram encontrados inibidores, e que de acordo com Temporal (2014), o agrupamento de moléculas supressoras pode resultar em frações com baixa atividade de indução de enzimas e de fitoalexinas. A supressão das respostas de defesa das plantas pode estar relacionada com a presença de proteínas, chamadas de efetores, que quando secretadas pelos nematoides suprimem as respostas de defesa do hospedeiro e auxiliam a infecção do mesmo (KVITKO et al., 2009). Essas proteínas regulam os mecanismos de defesa da planta, as quais induzem as células do vegetal a manter ou formar novos sítios de alimentação (GHEYSEN; MITCHUM, 2011), pois interagem e afetam a regulação da expressão de genes que culminam em alterações na função da célula hospedeira (GAO et al., 2003).

Quando uma fração purificada apresenta eliciadores capazes de induzir mecanismos de defesa vegetal e são reconhecidos pelos receptores celulares, vários sinais são enviados e então convertidos em respostas celulares. Nesse momento, genes ativados induzem a síntese de várias enzimas e entre elas estão envolvidas as que produzem fitoalexinas. No entanto, a síntese de faseolina e gliceolina nem sempre foi observada no presente trabalho, e este resultado pode estar relacionado com a ativação de outros mecanismos não avaliados neste estudo, mas que não descartam a possibilidade estudar outras rotas de ativação de resistência do hospedeiro.

Em outro trabalho desenvolvido por Gheysen e Mitchum (2011), os autores ressaltam que as proteínas efetoras dos nematoides podem evitar ou reprimir as respostas de defesa, e ao interagirem com as proteínas das plantas passam a controlar o desenvolvimento das mesmas, tal como o crescimento celular e transporte de auxinas. Doyle e Lambert (2003) relataram que a enzima corismato mutase, da qual são derivadas as fitoalexinas, ácido salicílico e auxinas produzidas na via do chiquimato, foi encontrada nas secreções de *M. javanica*, e como resultado

houve alterações no metabolismo secundário das células hospedeiras. Segundo Davis et al. (2008) a maioria dessas proteínas são produzidas nas glândulas esofagianas do nematoide (subventral e dorsal), e com auxílio do estilete são injetadas no citoplasma da planta.

Proteínas de *M. incognita*, envolvidas no parasitismo, têm sido purificadas e avaliadas quanto a sua capacidade de suprimir as respostas de defesa do hospedeiro e causar a infecção (BELLAFIORE et al., 2008). Os efetores de nematoides interagem com proteínas do hospedeiro e manipulam a fisiologia da planta (QUENTIN; ABAD; FAVERY, 2013), tal como os processos de sinalização e equilíbrios hormonal e celular (WANG et al., 2011).

Hewezi et al. (2010) verificaram que o *Heterodera schachtii* produz uma proteína efetora (10A06) que interage com a espermidina sintase presente nas plantas, que por sua vez altera a síntese de poliaminas e reduz a capacidade da planta em produzir compostos de defesa associados com o ácido salicílico. Hamamouch et al. (2012) observaram que a suscetibilidade de plantas de *Arabidopsis* à infecção causada por *H. schachtii* foi devido a inibição de proteínas relacionadas a patogênese, a β -1,3-endoglucanase, a partir de efetores (30C02). Para Rehman et al. (2009) a molécula efetora SprySec, secretada pelo nematoide *Globodera* spp., interagiu diretamente com a proteína de resistência de plantas de tomate sem induzir respostas de defesa.

Outros exemplos de moléculas secretadas por nematoides e que exercem influencia direta na interação planta-patógeno foram identificadas, tal como a proteína 16D10 presente na glândula dorsal de *M. incognita*, a qual foi encontrada interagindo com as proteínas das plantas durante o estabelecimento do seu parasitismo (HUANG et al., 2006). As proteases também são outro exemplo de proteínas secretadas por nematoides e que atuam nos mecanismos de infecção, as quais pertencem a diferentes classes como cisteínicas, serínicas, metaloproteases aspárticas e treonínicas (LOPEZ-OTIN; OVERALL, 2002).

As proteínas constituem uma grande porcentagem da massa dos organismos vivos, e Castagnone-Sereno et al. (2011) relataram que foram identificados diversos genes de proteases que compõe o genoma dos nematoides de galhas. Os autores afirmam ainda que essas proteínas podem servir como objeto de estudos no controle de nematoides fitopatogênicos. Essa característica reforça a importância do presente trabalho e de novas pesquisas voltadas a purificação de moléculas eliciadoras de caráter indutor de defesa vegetal a partir de nematoides.

Portanto, enquanto algumas proteínas efetoras suprimem as respostas de defesa das plantas, outras podem participar da sinalização de defesa das plantas hospedeiras e ou promover a formações dos sítios de alimentação dos nematoides (HAEGEMAN et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

O perfil cromatográfico de amostras provenientes de fêmeas dos nematoides *M. incognita* e *M. javanica*, por cromatografia de troca iônica e filtração em gel, indicaram a presença de eliciadores glicoproteicos e glicídicos capazes de induzir a síntese fitoalexinas.

Supressão de indução de gliceolina e faseolina foi verificada para algumas das frações testadas nos bioensaios.

Frações obtidas por cromatografia de troca iônica e posteriormente submetidas a cromatografia de filtração influenciaram na produção de fitoalexinas, pois algumas moléculas necessitam estarem atuando juntas para haver efeito eliciador e outras separadas e assim induzir a resposta de defesa no vegetal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABKHOO, J.; SABBAGH, S. K. Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, and gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascochylla nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 27, n. 4, p. 1-10, 2015.
- ADEGBITE, A. A.; ADESIYAN, S. O. Root extracts of plants to control Root-Knot Nematode on edible soybean. **World Journal of Agricultural Sciences**, New York, v. 1, n. 1, p. 18-21, 2005.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 .ed. San Diego: Academic Press, 2005, 922 p.
- ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological control of plant diseases: the European situation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 114, n. 3, p. 329-341, 2006.
- ALAMINO, D. A.; CABRAL, V. B.; DANNER, M. A.; MARCHESE, J. A. Indução de resistência à podridão amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 3, p. 249-254, 2013.
- ALMEIDA, F. A. de.; PETTER, F. A.; SIQUEIRA, V. C.; ALCÂNTARA NETO, F.; ALVES, A. U.; LEITE, M. L. T. Modos de preparo de extratos vegetais sobre *Meloidogyne javanica* no tomateiro. **Nematropica**, Bradenton, v. 42, n. 1, p. 9-15, 2012.
- ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. de. O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G. de.; STOLF-MOREIRA, R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; PEREIRA, P. R. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 163-172, 2012.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 28-34, 2013.
- ARAÚJO, F. F. de.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1558-1561, 2009.
- ARRUDA, R. S. de.; MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; NASCIMENTO, J. F. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 164-172, 2012.

ASMUS, G. L. Danos causados à cultura da soja por nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasita-hospedeiro nas meloidogynoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.39-62.

BAIDA, F. C.; SANTIAGO, D. C.; TAKAHASHI, L. S. A.; ATHANÁZIO, J. C.; CADIOLI, M. C.; LEVY, R. M. Reação de linhagens de feijão-vagem ao *Meloidogyne javanica* e *M. paranaenses* em casa-de-vegetação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 237-241, 2011.

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

BAIS, H. P.; PRITHIVIRAJ, B.; JHA, A. K.; AUSUBEL, F. M.; VIVANCO, J. M. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. **Nature**, London, v. 434, p. 217-221, 2005.

BALDO, M.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *In situ* detection of reactive oxygen species in bean plants treated with *Pycnoporus sanguineus* extracts and inoculated with *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 37, n. 4, p. 174-179, 2011.

BALLARÉ, C. L. Light Regulation of Plant Defense. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 335-363, 2014.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. de. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BECK, M.; HEARD, W.; MBENGUE, M.; ROBATZEK S. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. **Current Opinion in Biologia Vegetal**, Stuttgart, v. 15, n. 4, p. 367–374, 2012.

BECKERS, G. J. M.; CONRATH, U. Priming for stress resistance: From the lab to the field. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, n. 4, p. 425-431, 2007.

BEDNAREK, P.; SCHNEIDER, B.; SVATOS, A.; OLDHAM, N. J.; HAHLBROCK, K. Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots. **Plant Physiology**, San Diego, v. 138, p. 1058-1070, 2005.

BELLAFIORE, S.; SHEN, Z.; ROSSO, M. N.; ABAD, P.; SHIH, P.; BRIGGS, S. P. Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 4, n. 10, p. 1-12, 2008.

BENINCA, C. P.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V. C.; NOGUEIRA, M. A.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos

de *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 285-292, 2008.

BIRCH, P. R. J.; BOEVINK, P. C.; GILROY, E. M.; HEIN, I.; PRITCHARD, L.; WHISSON, S. C. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 11, n. 4, p. 373–379, 2008.

BONALDO, S. M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. 150 p. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

BONALDO, S. M., PASCHOLATI, S. F. Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 233-238, 2007.

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, cap. 1, p. 11-28, 2005.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribution for the study of antifungal and phytoalexins elicitors in sorghum and soybean activities by eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.

BORGES, F. G.; KUHN, O. J.; BATTISTUS, A. G.; ESTEVEZ, R. L.; COLTRO, S. Toxidade de tratamentos alternativos e químicos *in vitro* sobre *Tubixaba tuxaua* e *Meloidogyne incognita*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, suplemento, p. 440-449, 2013.

BORSATO, L. C.; DI PIERO, R. M.; STADNIK, M. J. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 318-322, 2010.

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

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 York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p.305-346, 2008.

BRODERSEN, P.; PETERSEN, M.; NIELSEN, H. B.; ZHU, S. J.; NEWMAN, M. A.; SHOKAT, K. M.; RIETZ, S.; PARKER, J.; MUNDY, J. Arabidopsis thaliana MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 4, 532-546, 2006.

CAILLAUD, M. C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; ENGLER, J. de. A.; ABAD, P.; ROSSO, M. N.; FAVERY, D. B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 1, p. 104-113, 2008.

CAMACHO, F.; PUCHADES, Y.; AGUILAR, A.; AMÍN, N., GARCÍA, A. OTERO, O.; SANTIAGOVISPO, N. Cromatografía de exclusión molecular como metodología para la purificación de bacteriófagos. **Vacci Monitor**, La Habana, v. 21, n. 2, p. 6-9, 2012.

CAMPOS, V. P. **Manejo de doenças causadas por fitonematoides**. Lavras: UFLV/FAEPE, p. 106, 1999.

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; FREITAS, L. G.; DICKSON, D. W. Attachment of en- dospores of *Pasteuria* penetrans to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 3, p. 267-271, 1999.

CASTAGNONE-SERENO, P.; DELEURY, E.; DANCHIN, E. G.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ABAD, P. Data-mining of the *Meloidogyne incognita* degradome and comparative analysis of proteases in nematodes. **Genomics**, San Diego, v. 97, n. 1, p. 29-36, 2011.

CASTRO, J. M. da. C.; LIMA, R. D. de.; CARNEIRO, R. M. D. G. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2003.

CAVALCANTE, F. M. de. L.; ALMEIDA, I. V. de.; MELO, K. A.; PANIZZON, C. P. do. N. B.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Interação patógeno planta: Respostas frente ao ataque. **SaBios: Revista da Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 8, n. 3, p. 90-97, 2013.

CAVALCANTI, F. R., RESENDE, M. L. V. OLIVEIRA, J. T. A. Peroxidases ativadas por frações proteicas de extrato biológico eficaz na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 507-511, 2007.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V. de.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. de. C. do. B.; CARVALHO, C. P. da. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006.

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. de; ROMEIRO, R. da. S. (Ed.), **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 263, 2005.

CAVERO, P. A. S.; HANASA, R. E.; GASPAROTTO, L.; COELHO NETO, R. A.; SOUZA, J. T. Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 6, p. 951-957, 2015.

CHARCHAR, J. M.; HORINO, Y.; MOITA, A. W. Reação de cultivares de feijão-de-vagem em áreas infestadas por *Meloidogyne javanica*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 77, 1995.

CLARKE A.; DESIKAN, R.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. No way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **The Plant Journal**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 667-677, 2000.

CLARKE, A.; MUR, L. A. J.; DARBY, R. M.; KENTON, P. Harpin modulates the accumulation of salicylic acid by *Arabidopsis* cells via apoplastic alkalization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 422, p. 3129-3136, 2005.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, p. 88-95, 2005.

COLL, N. S.; EPPLER, P.; DANGL, J. L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death and Differentiation**, Amsterdam, v. 18, n. 8, p. 1247-1256, 2011.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, p. 17-45, 2006.

COLPAS, F. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FERRARESE, M. L.; SCAPIM, C. A.; BONALDO, S. M. Indução de mecanismos de defesa em plantas por extrato de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 3, p. 191-195, 2009.

COLTRO-RONCATO, S.; GONÇALVES, E. D. V.; DILDEY, O. D. F.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Fitoquímicos como controle alternativo de nematoides. In: KUHN, O. J.; NUNES, R. V.; STANGARLIN, J. R.; RAMPIM, L.; FEY, R.; COSTA, N. V. da.; COSTA, P. B.; GUIMARÃES, V. F.; ZAMBOM, M. A. **Ciências Agrárias: Tecnologias e Perspectivas**. Marechal Cândido Rondon: Ed. Unioeste., 1 ed., 2015. p. 188-206.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The Nature and practice of biological control of plant pathogens. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, 1983.

COSTA, M. J. N.; OLIVEIRA, N.; COELHO, S. J.; CAMPOS, V. P. Nematoides em plantas ornamentais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1127-1132, 2001.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG), 2006. 382 p.

DALIO, R. J. D.; MAGALHAES, D. M.; ATILIO, L. B.; RODRIGUES, C. M.; BRETON, M. C.; PICHI, S.; PASCHOLATI, S. F.; MACHADO, M. A. Efeitos na Interações Planta-patógeno. Revisão Anual de Patologia de Plantas. 22ed. Passo Fundo: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 22, p. 25-68, 2014.

DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A.; THOMAS, H. Senescence and programmed cell death. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, Lancaster, p. 1044-1100, 2000.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, London, v. 411, p. 826-833, 2001.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; MITCHUM, M. G.; BAUM, T. J. Parasitism proteins in nematode-plant interaction. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 11, n. 4, p. 360-366, 2008.

DE WIT, P. J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cell Molecular Life Science**, Basel, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007.

DEFFUNE, G. Semioquímicos, fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal na agricultura orgânica: a explicação dos defensivos agrícolas. In: Hortibio: 1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica. Resumos. **Agroecológica**, Botucatu, p. 33-43, 2001.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química nova na escola: Cromatografia**, São Carlos, n. 7, p. 21-25, 1998.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S. **Nematoides em Soja: Identificação e Controle**. Circular Técnico. Embrapa, Londrina, 2010.

DI PIERO, R. M.; WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial purification of elicitors from *lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 175-180, 2006.

DI PIERO, R. M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CALVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 29-50, 2005.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; SANTANA-GOMES, S. de. M.; PUERARI, H. H.; FONTANA, L. F.; RIBEIRO, L. M.; MATTEI, D. Induced resistance in the nematodes control. **African Journal of Agricultural Research**, St. Albans, v. 8, n. 20, p. 2312-2318, 2013.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 479-501, 1994.

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

DOYLE, E. A.; LAMBERT, K. N. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, n. 2, p. 123-131, 2003.

DUBREUIL, G.; MAGLIANO, M.; DELEURY, E.; ABAD, P.; ROSSO, M. N. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitismo. **New Phytologist**, Cambridge, v. 176, n. 2, p. 426-436, 2007.

DURANGO, D.; QUINÔNES, W.; TORRES, F.; ROSERO, Y.; GIL, J.; ECHEVERRI, F. Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. **Molecules**, Basel, v. 7, n. 11, p. 817-832, 2002.

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

ELVIRA, M. I.; GALDEANO, M. M.; GILARDI, P.; GARCÍA-LUQUE, I.; SERRA, M. T. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 1253-1265, 2008.

ETTRE, L. S. M. S. Tswett and the invention of chromatography”, **LCGC North America**, New Haven, v. 21, p. 458-467, 2003.

FARIA, C. M. D. R.; SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, H. D.; RESENDE, M. L. V.; CAMPOS, V. P.; COIMBRA, J. L. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóide-planta. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, v. 11, cap. 11, p. 373-410, 2003.

FERNANDES, C. de. F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G. da.; REIS, N. D.; ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Documentos / Embrapa Rondônia, Porto Velho, 14 p. 2009.

FERNÁNDEZ-HERRERA, E., ROJAS-MARTÍNEZ, R. I.; GUEVARA-OLVERA, L.; RIVAS-DÁVILA, M. E.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; ZAVALA-MEJÍA, E. Defensa en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. **Nematropica**, Bradenton, v. 42, n. 1, p. 96-107, 2012.

FERRAZ, C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, São Paulo, v. 1, p. 168-201, 1995.

FERRAZ, L. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, São Paulo, p. 277-305, 2011.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidogynoses da soja: passado, presente e futuro. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidogynoses da soja**. Embrapa Soja, Londrina, 2001.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. L. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Editora: UFV, Viçosa, 1. ed, 2012, p. 106-114.

FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B.; PRABHU, A. S. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 5, p.387-392. 2007.

FRANZENER, G. **Caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso de *Eucalypto citriodora***. 2011. 217 p. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM - Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Maringá, 2011.

FRANZENER, G.; VIGO, S. C.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; FURLANETTO, C. Atividades fungitóxicas e elicitora de fitoalexinas no extrato aquoso e tintura vegetal de plantas medicinais. In: Congresso brasileiro de fitopatologia, 33, Belém, 2000. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25 (Suplemento), p. 374, 2000.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. da. S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; FABRY, C. F. S.; MARRA, B. M.; COUTINHO, M. M.; ROMEIRO, R. S.; FERRAZ, S. Isolamento e seleção de rizobactérias para o controle de nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Campina, v. 29, p. 215-220, 2005.

GALHÃO, M. I.; CORTELAZZO, A. L.; FEVEREIRO, M. P. S.; BRITO, E. S. de. Biochemical and Morphological Responses to Abiotic Elicitor Chitin in Suspension-Cultured Sugarcane Cells. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 53 n. 2, p. 253-260, 2010.

GAO, B.; ALLEN, R.; MAIER, T.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, n. 8, p. 720-726, 2003.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. P. 109-132.

GASSMANN, W.; BHATTACHARJEE, S. Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 25, n. 7, p. 862-868, 2012.

GHEYSEN, G.; JONES, J. T. Molecular aspects of plant-nematode interactions. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.) **Plant Nematology**, Farnham Royal, 2. ed, p. 274-298, 2013.

GHEYSEN, G.; MITCHUM, M. G. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 14, n. 1, p. 415-421, 2011.

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

GIEBEL, J. Mechanism of resistance to plant nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 257-279, 1982.

GIEBEL, J. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activities in potato roots and their significance in potato resistance to *Heterodera rostochiensis*. **Nematologica**, Leiden, v. 19, n. 1, p. 3-6, 1973.

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

GONÇALVES, E. D. V.; STANGARLIN, J. R.; COLTRO-RONCATO, S.; DILDEY, O. D. F.; MEINERZ, C. C.; KUHN, O. J. Cromatografia de filtração em gel para a purificação de moléculas proteicas e glicídicas a partir de nematoides fitopatogênicos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 13, n. suplemento, p. 353-357, 2014.

GRAHAM, T. L. Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. (Ed.) **Handbook of phytoalexin metabolism and action**. New York, p. 85-117, 1995.

GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Defense potentiation and competency: redox conditioning effects of salicylic acid and genistein. **Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 5, p. 181-220, 2000.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 9, n. 4, p. 414-420, 2006.

GUGINSKI-PIVA, C. A.; SANTOS, I. dos.; WAGNER JÚNIOR, A.; HECK, D. W.; FLORES, M. F.; PAZOLINI, K. Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber. **IDESIA**, Arica, v. 33, n. 1, p. 39-47, 2015.

GUIMARÃES, S. S.; MAZARO, S. M.; FREDDO, Á. R.; WAGNER JÚNIOR, A. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 143-149, 2015.

HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J. T.; GHEYSEN, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, Amsterdam, v. 492, n. 1, p. 19-31, 2012.

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

HALLMANN, J.; FAUPEL, A.; KRECHEL, A.; SIKORA, R. A.; BERG, G. Endophytic bacteria and biological control of nematodes. **Bulletin OILB/SROP**, v. 27, n. 1, p. 83-94, 2004.

HAMAMOUCHE, N.; LI, C.; HEWEZI, T.; BAUM, T. J.; MITCHUM, M. G.; HUSSEY, R. S.; VODKIN, L. O.; DAVIS, E. L. The interaction of the novel 30C02 cyst nematode effector protein with a plant β -1,3-endoglucanase may suppress host defence to promote parasitism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 10, p. 3683-3695, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Nova Delhi: I. K. International Private Limited, p.1102-1203, 2000.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. **An Advanced Treatise on Meloidogyne**, North Carolina: University Graphics, p. 69-77, 1985.

HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 1385-1396, 2007.

HEIL, M.; BOSTOCK, M. R. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 5, p. 503-512, 2002.

HELING, A. L.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Controle biológico de *Mycosphaerella fragariae* na cultura do morangueiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. 4, p. 221-228, 2015.

HEWEZI, T.; P. J. HOWE, P. J.; MAIER, T. R.; HUSSEY, R. S.; MITCHUM, M. G.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. Arabidopsis Spermidine Synthase Is Targeted by an Effector Protein of the Cyst Nematode *Heterodera schachtii*. **Plant Physiology**, San Diego, v. 152, n. 2, p. 968-984, 2010.

HOGENHOUT, S. A.; VAN DER HOORN, R. A. L.; TERAUCHI, R.; KAMOUN, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2009.

HUANG, G.; DONG, R.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 5, p. 463-470, 2006.

HUANG, Z.; YEAKLEY, J. M.; GARCIA, E. W.; HOLDRIDGE, J. D.; FAN, J. B.; WHITHAM, S. A. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. **Plant Physiology**, San Diego, v. 137, n. 3, p. 1147-1159, 2005.

HUMPHREYS, J. M. CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, n. 3, p. 224-229, 2002.

IBRAIM, S. K. Peroxidase isoenzyme from *Meloidogyne* spp. culture on different hosts. **Review of Plant Nematology**, v. 14, n. 3, p. 335-344, 1991.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, Paraná. 2009.

JALALI, B. L.; BHARGAVA, S.; KAMBLE A. Signal Transduction and Transcriptional Regulation of Plant Defence Responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 2, p. 65-74, 2006.

JAMMES, F.; LECOMTE, P.; ALMEIDA-ENGLER, J. de.; BITTON, F.; MARTIN-MAGNIETTE, M. L.; RENOU, J. P.; ABAD, P.; FAVERY, B. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 447-458, 2005.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 323-329, 2006.

JONES, J. T.; FURLANETTO, C.; BAKKER, E.; BANKS, B.; BLOK, V.; CHEN, Q.; PHILLIPS, M.; PRIOR, A. Characterization of a chorismate mutase from the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 43-50, 2003.

JONES, J. T.; SMANT, G.; BLOK, V. C. SXP / RAL-2 proteínas do nematoide de cisto da batata *Globodera rostochiensis*: proteínas segregadas de hipoderme e amphids. **Nematology**, Leiden, v. 2, n. 8, p. 887-893, 2000.

JUHÁSZ, A. C. P.; PÁDUA, G. P. de.; WRUCK, D. S. M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO, N. R. **Desafios fitossanitários para a produção de soja**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 34, n. 276, p. 66-75, 2013.

JULIATTI, F. C.; WALBER, R.; SANTOS, Ú. A.; SAGATA, E. Reação de acessos de feijoeiro a nematoides de galhas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 5, p. 763-769, 2010.

KAMOUN, S. A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 41-60, 2006.

KIRALY, L.; BARNA, B.; KIRALY, Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 7-8, p. 385-396, 2007.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 36, n. 2, p. 107-114, 2010.

KUHN, R. A.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R. Uso da biomassa cítrica no controle de doenças da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 8, n. 1-2, p. 85-98, 2009.

KVITKO, B. H.; PARK, D. H.; VELÁSQUEZ, A. C.; WEI, C. F.; RUSSELL, A. B.; MARTIN, G. B.; SCHNEIDER, D. J.; COLLMER, A. Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 4, 1000388, 2009.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolina em soja**. 2002. 118 p. Dissertação

(Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest News. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, n. 3, p. 323-328, 2004.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LATIF, N. S. A.; WAKE, G. C.; REGLINSKI, T.; ELMER, P. A. G. Modelling induced resistance to plant diseases. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 347, p. 144-150, 2014.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 199-208. 2001.

LEANDRO, H. M.; ASMUS, G. L. Rotação e sucessão de culturas para o manejo do nematoide reniforme em área de produção de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 6, p. 945-950, 2015.

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

LOPES, C. A. Controle de doenças de plantas na olericultura orgânica: qual o tamanho do desafio?. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.30, n. 3, p. 565-565, 2012.

LOPES, L. P.; OLIVEIRA JR. A. G.; BERANGER, J. P. O.; GÓIS, C. G.; VASCONCELLOS, F. C. S.; SAN MARTIN, J. A. B.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. Against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 233-238, 2012.

LOPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 509-519, 2002.

LORDELLO, L.G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. 8. ed., Nobel: São Paulo, 314p, 1988.

MANOSALVA P.; MANOHAR, M.; VON REUSS, S. H.; CHEN, S.; KOCH, A.; KAPLAN, F.; CHOE, A.; MICIKAS, R. J.; WANG, X.; KOGEL, K. H.; STEMBERG, P. W.; WILLIAMSON, V. M.; SCHROEDER, F. C.; KLESSIG, D. F. Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. **Nature Communications**, New York, v. 6, n. 7795, p. 1-8, 2015.

MARCHESE, J. A.; MATTANA, R. S.; MING, L. C.; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P. F.; MORAES, R. M. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. **Photosynthetica**, Prague, v. 46, p. 501-505, 2008.

MATEUS, M. A. F.; FARIA, C. M. D. R.; BOTELHO, R. V.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERREIRA, S. G. M.; ZALUSKI, W. L. Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne incognita* (Kofoed e White, 1919) Chitwood, 1949. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 730-736, 2014.

MATIELLO, J.; BONALDO, S. M. Atividade elicitora de fitoalexinas em Soja e Sorgo por extratos e tinturas de espécies medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 541-550, 2013.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A. de.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1824-1829, 2008.

MAZARO, S. M.; FOGALARI, H.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I.; SANTOS, I. Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 208-216, 2013.

MEINERZ, C. C.; FORMIGHIERI, A. P.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; DIETERICH, C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 26-31, 2008.

MEINERZ, C. C.; MULLER, S. F.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PORTZ, R. L.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Elicidores proteicos e glicídicos de *Adiantum capillus-veneris* L. para fitoalexinas em sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 794-803, 2014.

MENDES, M. L.; RODRIGUEZ, P. B. N. Reação de cultivares de soja [(*Glycinemax* (L.) Merrill] aos nematoides de galhas *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raças 1, 2, 3, 4. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 211-217, 2000.

MÉTRAUX, J. P. Induced defenses in plants. In: Rodrigues, F. A.; Romeiro, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. UFV, Viçosa, p. 7-24, 2007.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, 2001.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. **Plant Physiology**, San Diego, v. 146, n. 3, p. 825-831, 2008.

MITKOWSKLI, N. A.; ABAWI, G. S. Nematóide das galhas (Portuguese translation by LOPES, E.A.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; VIEIRA, B. S. 2011) **The Plant Health Instructor**, 2003.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p.73-79, 2003.

MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27. s/n. p. 175-190, 1992.

MOREIRA, C. G. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium* **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, n. 4, p. 332-337, 2008.

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

MÜLLER, K. O.; BORGER, H. Experimentelle Untersuchungen über die phytophthora resistenz der Kartoffel-zugleich ein Beitrag zum Problem der 'erworbenen Resistenz' im Pflanzenreich. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 189-231, 1940.

MÜLLER, M. A.; MIORANZA, T. M.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J. BATTISTUS, A. G.; ISTCHUK, A. N.; FUCHS, F. In vitro toxicity and control of *Meloidogyne incognita* in soybean by rosemary extract. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 103-110, 2016.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 2, p. 323-328, 2001.

NEWMAN, M. A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J. T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, New Haven, v. 16, n. 4, p. 139, 2013.

NUNES, H. T.; MONTEIRO, A. C.; POMELA, A. W. V. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 403-409, 2010.

NURNBERGER, H.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into na old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 6, n. 3, p. 335-345, 2005.

OBWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; COELHO, A. C.; CRAVADOR, A.; DIEZ, J.; DALIO, R. J.; HORTA JUNG M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA. A.; CECH, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.; HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L. B.; PARKE, J.; PROSPERO, S.; WERRES, S. Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 44, n. 3, p.169-190, 2014.

PASCHOLATI, S. F.; BLUMER, S.; REZENDE, D.C.; BRAND, S. C. Indução de resistência novos conceitos e aplicações. **Anais do X Simpósio de Controle de Doenças de Plantas e V Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas**. Lavras, MG, 2010.

PASCHOLATI, S. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronômica Ceres, São Paulo, 4. ed, v. 1, p. 593-636, 2011.

PAXTON, J. D. Soybean phytoalexin: elicitation, nature, mode of action and role. In: Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. (Ed.) **Handbook of phytoalexin metabolism and action**, New York, p. 69-83, 1995.

PEDROSA, E. M. R., MOURA, R. M.; SILVA, E. G. Respostas de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à meloidoginose e alguns mecanismos envolvidos na reação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 190-196, 2000.

PENG, X.; ZHANG, H.; BAI, Z.; LI, B. Induced Resistance to *Cladosporium cucumerinum* in Cucumber by Pectinases Extracted from *Penicillium oxalicum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 32, n. 4, p. 377-387, 2004.

PITTA-ALVAREZ, S. I.; SPOLLANSKY, T. C.; GIULIETTI, A. M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 2-4, p. 252-258, 2000.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUENTIN, M.; ABAD, P.; FAVERY, B. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. **Frontiers in Plant Science**, New York, v. 4, n. 53, p. 1-7, 2013.

QIU, J.; HALLMANN, J.; KOKALIS-BURELLE, N.; WEAVER, D. B.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; TUZUN, S. Activity and differential induction of chitinase isozymes in soybean cultivars resistant or susceptible to root-knot nematodes. **Journal of Nematology**, Florida, v. 29, n. 4, p. 523-530, 1997.

REHMAN, S.; POSTMA, W.; TYTGAT, T.; PRINS, P.; QIN, L.; OVERMARS, H.; VOSSEN, J.; SPIRIDON, L.-N.; PETRESCU, A.-J.; FOVERSE, A.; BAKKER, J.; SMANT, G. A Secreted SPRY Domain-Containing Protein (SPRYSEC) from the Plant-Parasitic Nematode *Globodera rostochiensis* Interacts with a CC-NB-LRR Protein from a Susceptible Tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 3, p. 330-340, 2009.

RESENDE, M. L. V. de.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L. de.; SILVA, D. D. da.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. de. O.; PEREIRA, L. de.; MATOS.; CAMPOS, M. de. A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 129-198, 2007.

RIBEIRO, C. A. G.; FERRAZ, S. Estudos da interação entre *Meloidogyne javanica* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 439-446, 1983.

RIVERA-VARGAS, L. I.; SCHMITTHENNER, A. F.; GRAHAM, T. L. Soybean flavonoid effects and metabolism by *Phytophthora sojae*. **Phytochemistry**, New York, v. 32, n. 4, p. 851-857, 1993.

ROBERTSON, L.; ROBERTSON, W. M.; SOBCZAK, M.; HELDER, J.; TETAUD, E.; ARIYANAYAGAM, M. R.; FERGUSON, M. A. J.; FAIRLAMB, A.; JONES, J. T. Cloning,

expression and functional characterisation of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 41-49, 2000.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.

ROESE, A. D.; OLIVEIRA, R. D. L.; LANES, F. F. Reações de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) a *Meloidogyne paranaenses*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 131-135, 2004.

ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas, p.139-166, 2006.

SCHMITT, D. P.; NOEL, G. R. Nematode Parasites of Soybeans, In: W.R. Nickel (Ed.). **Plant and Insect Parasitic Nematodes**. St. Albans, p. 445-449, 1984.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno-fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. Cap. 9, p. 227-248.

SCOTT, R. P. W. “**Principles and Practice of Chromatography**”, Chrom-Ed Book Series (2003), <http://www.library4science.com/eula.html>.

SEREGÉLYES, C.; BARNA, B.; HENNIG, J.; KONOPKA, D.; PASTERNAK, T. P.; LUKÁCS, N.; FEHÉR, A.; HORVÁTH, G. V.; DUDITS, D. Phytoglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 3, p. 541-550, 2003.

SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Effect of *Bacillus* spp. Toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 20, p. 53-62, 1996.

SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Inseticida neonicotinóide induz resistência ao cancro cítrico em laranja doce. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 65-75, 2012.

SIMÃO, G.; HOMECHIN, M.; SANTIAGO, D. C.; SILVA, R. T. V.; RIBEIRO, E. R. Comportamento de duas cultivares de feijoeiro em relação à *Meloidogyne javanica*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 266-270, 2005.

SIMÃO, G.; ORSINI, I. P.; SUMIDA, C. H.; HOMECHIN, M.; SANTIAGO, D. C.; CIRINO, V. M. Reação de cultivares e linhagens de feijoeiro em relação a *Meloidogyne javanica* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1003-1008, 2010.

SIMÕES, K.; DIETRICH, S. M. C.; HAHN, M. G.; BRAGA, M. R. Purification and characterization of a phytoalexin elicitor from spores of the saprobe *Mucor ramosissimus*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 735-744, 2005.

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

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T.; 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. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap. 3, p.51-80, 2005.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; MANSFIELD, J. W.; Ultrastructural characterisation of pathogen development and host responses during compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Peronospora parasitica*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, n. 2, p. 67-78, 2004.

SPADARO, A. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006, p.103-137.

STANGARLIN, J. R. SCHULZ, D. G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; KUHN, O. J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2010.

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

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. Science Against Microbial Pathogens: **Communicating Current Research And Technological Advances**, Badajoz, v. 2, n. 3, p. 1033-1042, 2011.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-21, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, Porto Alegre: Artmed, 4. ed., p. 719, 2009.

TEMPORAL, W. M. **Caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* e capacidade de indução de mecanismos de resistência em soja**. 2014. 98 p. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, Maringá, Paraná. 2014.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2000.

TON, J.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 15, p. 27-34, 2002.

VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 6, p. 1920-1934, 2004.

VAZ, M. V.; CANEDO, E. J.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*, **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**, Pato de Minas, v. 1, n. 8, p. 203-212, 2011.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 87-96, 2009.

VILLAR-LUNA, E.; ROJAS-MARTÍNEZ, R. I.; REYES-TREJO, B.; ROCHA-SOSA, M.; ZAVALA-MEJÍA, E. expression of hydroxymethylglutaryl-coa reductase 2 (*HMG2*) GENE in chilli (*Capsicum annuum* L.) cm334 infected by *Nacobbus aberrans* and *Phytophthora capsici*. **Agrociência**, Montecillo, v. 49, n. 1, p. 69-75, 2015.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defense a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, p. 258, 2007.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance: helping plants to help themselves. **Biologist**, Urbana, v. 52, n. 1, p. 28-33, 2005.

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 12, p. 1368-1373, 2005.

WALTERS, D. R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, Guildford v. 28, n. 6, p. 459-465, 2009.

WANG, J.; REPLOGE, A.; HUSSEY, R.; BAUM, T.; WANG, X.; DAVIS, E. L.; MITCHUM, M. G. Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plantparasitic nematode *Heterodera schachtii*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 12, n. 2, p. 177-186, 2011.

WU, C. T.; BRADFORD, K. J. Class I chitinase and beta 1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, San Diego, v. 133, p. 263-273, 2003.

WU, S.; SHAN, L.; HE, P. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. **Plant Science**, Limerick, v. 228, p. 118-126, 2014.

XU, F.; CAI, R.; CHENG, S.; DU, H.; WANG, Y.; CHENG, S. Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 721-729, 2008.

YANG, C.; GUO, R.; JIE, F.; NETTLETON, D.; PENG, J.; CARR, T.; YEAKLEY, J. M.; FAN, J. B.; WHITHAM, S. A. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 4, p. 358–370, 2007.

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

ZHANG, J.; LU, H.; LI, X.; LI, Y.; CUI, H.; WEN, C-K.; TANG, X.; SU, Z.; ZHOU, J-M. Effector-Triggered and Pathogen-Associated Molecular Pattern–Triggered Immunity Differentially Contribute to Basal Resistance to *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, n. 7, p. 940-948, 2010.