

# Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita

Douglas Alvarez Alamino<sup>(1)</sup>, Vagner Bandeira Cabral<sup>(1)</sup>, Moeses Andriago Danner<sup>(2)</sup> e José Abramo Marchese<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal, Via do Conhecimento, Km 01, CEP 85503-090 Pato Branco, PR. E-mail: doug\_biologo\_@hotmail.com, vbccabral@yahoo.com.br, abramo@pq.cnpq.br <sup>(2)</sup>UTFPR, Campus Dois Vizinhos, Estrada para Boa Esperança, km 4, CEP 85660-000 Dois Vizinhos, PR. E-mail: moesesdanner@utfpr.edu.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos eliciadores acibenzolar-S-metilico (ASM) e proteína harpina, aplicados em pós-colheita, na indução de resistência sistêmica à podridão-amarga em maçãs. Realizaram-se ferimentos mecânicos em maçãs 'Royal Gala' seguidos da aplicação dos eliciadores. Doze horas depois, procedeu-se à inoculação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Após 72 horas, realizaram-se as avaliações quanto à área lesionada e ao número de esporos, bem como a coleta de tecido dos frutos para quantificação de proteínas, açúcares totais e redutores, fenóis totais, e para determinação da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, superóxido dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase. A harpina e, em menor grau, o ASM proporcionaram aumento da atividade da enzima peroxidase e a consequente redução da área lesionada e da esporulação de *C. gloeosporioides* nas maçãs. Esses eliciadores podem ser utilizados como ferramenta de controle no manejo integrado da podridão-amarga, em pós-colheita de maçãs 'Royal Gala'.

Termos para indexação: *Colletotrichum gloeosporioides*, acibenzolar-S-metilico, enzimas antioxidativas, proteína harpina, resistência sistêmica adquirida.

## Induction of resistance to bitter rot in apples by the use of elicitors in the postharvest

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of the protein elicitors acibenzolar-S-methyl (ASM) and harpin, applied during the postharvest handling, on a systemic resistance induction to bitter rot on apple. Mechanical injury were made on 'Royal Gala' apples, followed by application of the elicitors. Twelve hours later, inoculation of *Colletotrichum gloeosporioides* was performed. Seventy-two hours later, evaluations were done for the injured area and the number of spores, and tissue samples were taken to determine the contents of proteins, total and reducing sugars, total phenolics, and the activity of phenylalanine ammonia-lyase, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, and ascorbate peroxidase enzymes. Harpin, and to a lesser extent, ASM increased the activity of peroxidase enzyme and, in consequence, reduced the injured area and sporulation caused by *C. gloeosporioides* in apples. These elicitors could be used as a control tool in the integrated management of bitter rot in the postharvest handling of 'Royal Gala' apples.

Index terms: *Colletotrichum gloeosporioides*, acibenzolar-S-methyl, antioxidative enzymes, harpin protein, systemic acquired resistance.

## Introdução

A podridão-amarga, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, é a principal doença pós-colheita em maçãs da cultivar Gala (Rizzon et al., 2005). Os frutos se tornam mais suscetíveis à doença à medida em que amadurecem, mas a infecção pode ocorrer ainda no início do desenvolvimento do fruto. Ferimentos facilitam a infecção. Os sintomas aparecem na epiderme dos frutos, na forma de lesões circulares, de cor parda ou marrom, deprimidas no centro. Os conídios do fungo se desenvolvem sobre estas lesões,

têm coloração alaranjada e são dispersos principalmente pela água. Durante o período de repouso vegetativo da macieira, o fungo sobrevive em frutos mumificados e cancos nos ramos (Boneti et al., 2002).

A principal forma de controle da podridão-amarga é a aplicação de fungicidas sintéticos em pré-colheita (Boneti et al., 2002). O uso indiscriminado desses fungicidas pode deixar resíduos nos frutos e selecionar o fungo quanto a resistência aos ingredientes ativos utilizados. Isto tem estimulado a pesquisa de métodos alternativos de controle em pós-colheita (Felipini & Di Piero, 2009).

Uma das alternativas estudadas atualmente é a aplicação de compostos químicos eliciadores que desencadeiam a ativação de vários genes nas plantas. Como resultado, ocorrem a síntese e a acumulação de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína rica em hidroxiprolina), ácidos salicílico e jasmônico, que funcionam como: sinalizadores para a expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-RP), inibidores de enzimas e como enzimas hidrolíticas e do metabolismo secundário (Durrant & Dong, 2004; Jalali et al., 2006). Outro mecanismo ativado pelos eliciadores é a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ), as quais causam danos irreparáveis às membranas celulares. Para reduzir estes danos, a célula ativa mecanismos de destoxificação, com a ativação de enzimas, como: a superóxido dismutase, que age como um catalisador da dismutação do  $O_2^-$  e  $HO_2^+$  a  $H_2O_2$  (Alscher et al., 2002; Marchese et al., 2008); a catalase e a ascorbato peroxidase, que atuam na destoxificação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Mittler et al., 2004); e a peroxidase, que atua na remoção do  $H_2O_2$  (Meriga et al., 2004), na oxidação de fenóis, na síntese de compostos fenólicos tóxicos aos fungos e na síntese de lignina (Hsu & Kao, 2003; Campos et al., 2004).

O eliciador comercial mais estudado na atualidade é o composto sintético acibenzolar-S-metilico (ASM), análogo ao ácido salicílico que gera um sinal sistêmico de transdução de genes que codificam proteínas-RP e enzimas relacionadas à produção de fitoalexinas e lignina (Danner et al., 2008; Goellner & Conrath, 2008). No Brasil, o ASM é liberado para aplicação foliar em algodoeiro, batateira, cacauzeiro, citros, feijoeiro, meloeiro e tomateiro (Brasil, 2012). Outro eliciador comercial que merece destaque é a harpina, uma proteína produzida por bactérias, que ativa a síntese de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, o ácido jasmônico e o etileno (Clarke et al., 2005). Produtos à base de harpina são liberados para uso como indutor de resistência nos Estados Unidos, em todas as culturas agrícolas, árvores e plantas ornamentais (United States Environmental Protection Agency, 2005). Estes dois eliciadores causam a redução de podridões de frutos em pós-colheita (Capdeville et al., 2003; Danner et al., 2008; Mazaro et al., 2008).

Assim, os eliciadores fazem com que as plantas ativem seus próprios mecanismos de defesa e, quando expostas novamente a um fator de estresse (biótico ou abiótico), as plantas respondem de forma mais rápida e efetiva ao estímulo. Este efeito é denominado de resistência sistêmica adquirida (Durrant & Dong, 2004; Goellner & Conrath, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos eliciadores acibenzolar-S-metilico e proteína harpina, aplicados em pós-colheita, na indução de resistência sistêmica à podridão-amarga em maçãs da cultivar Royal Gala.

## Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, estado do Paraná. Foram colhidos frutos da cultivar de macieira Royal Gala, oriundos de pomar no Município de Palmas, PR. Os procedimentos metodológicos foram baseados nos descritos por Danner et al. (2008). Os frutos foram selecionados quanto à homogeneidade de tamanho, grau de maturação e boa sanidade, desinfestados superficialmente com imersão em hipoclorito de sódio a 0,5%, por 3 min, e lavados em água corrente. Em seguida, foram deixados para secar à temperatura ambiente, por 10 min. Foram realizados ferimentos em dois lados opostos dos frutos, localizados na porção equatorial, com profundidade de 1 cm, com uso de um perfurador com 5 agulhas de 0,25 mm de diâmetro.

Realizou-se a pulverização de 1 mL de solução aquosa, que continha os eliciadores, sobre a superfície total dos frutos, com uso do borrifador. O acibenzolar-S-metilico (ASM) foi aplicado à concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> do i.a, com utilização do produto comercial Bion (Syngenta Crop Protection, Münchwilen, Suíça). A harpina foi aplicada à concentração de 80 mg L<sup>-1</sup>, com utilização do ProAct (Eden Bioscience Corp., Bothell, WA, EUA). Os frutos da testemunha foram pulverizados com 1 mL de água destilada.

Os frutos foram acondicionados sobre anéis de policloreto de vinila (PVC), de 50 mm de diâmetro e 2,0 cm de altura, contidos em caixas de plástico (23x17x10 cm) forradas com papel-toalha umedecido, para formar uma câmara úmida. As caixas,

hermeticamente fechadas, foram mantidas em câmara de crescimento (B.O.D.), com temperatura controlada ( $24\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas, sem controle da umidade relativa. Depois de 12 horas de acondicionamento nas caixas, foi realizada a inoculação de *C. gloeosporioides* nos frutos, com a aplicação de 0,2 mL da suspensão de esporos a  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ , em cada lado do fruto. O fungo foi isolado de maçãs 'Royal Gala' com sintomas típicos da podridão-amarga. Para o preparo da suspensão, realizou-se a coleta de conídios dos frutos, com o auxílio de pincel, o qual foi mergulhado em um frasco com 10 mL de água destilada. A concentração final de esporos foi definida com a utilização da câmara de Neubauer.

Os frutos foram avaliados 72 horas após a inoculação. Para a quantificação da área da superfície dos frutos lesionada por *C. gloeosporioides*, mediram-se quatro raios, a partir do centro da lesão, nas direções superior, inferior, esquerda e direita, em ambos os lados dos frutos, com paquímetro digital. Para o cálculo da área lesionada, foi utilizada a fórmula da área do círculo  $A = \pi r^2$ , em que  $r$  é o raio médio da lesão. Utilizaram-se os dados de área lesionada, para calcular a eficiência de controle dos tratamentos, com base na equação,  $E = [(A_t - A_e) \times 100] / A_t$ , em que:  $E$ , eficiência (%);  $A_t$ , = área lesionada no tratamento testemunha;  $A_e$ , área lesionada no tratamento com eliciador. Para a contagem de esporos, foi realizada a raspagem com estilete, em  $1,0 \text{ cm}^2$ , no centro de cada lesão. Em seguida, o estilete foi mergulhado em um frasco com 10 mL de água destilada esterilizada. A quantificação do número de esporos na suspensão foi feita com uso de câmara de Neubauer.

Efetuiu-se, também, a coleta de pedaços dos frutos de  $1,0 \text{ cm}^2$  e  $6,0 \text{ mm}$  de profundidade, na região limitrofe à lesão. Estes pedaços foram acondicionados em sacos de plástico devidamente lacrados, identificados e armazenados em freezer a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, realizou-se, por meio de espectrofotometria, a quantificação dos teores de: proteínas totais (Bradford, 1976), açúcares totais (Dubois et al., 1956), açúcares redutores (Miller, 1959), fenóis totais, de acordo com método adaptado de Nozella (2001), e atividades das enzimas catalase e peroxidase (Peixoto et al., 1999), ascorbato peroxidase (Koshiba, 1993), superóxido dismutase (Giannopolitis & Ries, 1977) e fenilalanina amônia-liase, de acordo com método adaptado de Zucker (1965).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições (bandejas) de quatro frutos cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e a comparação de médias foi realizada por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade, com o programa Assistat (Silva & Azevedo, 2002).

## Resultados e Discussão

Os eliciadores promoveram a redução da área lesionada por *C. gloeosporioides*. O acibenzolar-S-metílico reduziu a área lesionada dos frutos em 36,9%, enquanto a harpina a reduziu em 45,9%. Porém, apenas os frutos com aplicação de harpina tiveram área lesionada significativamente menor do que a testemunha, mas os dois eliciadores não diferiram entre si (Tabela 1). A esporulação do fungo foi significativamente menor com o uso dos eliciadores, em comparação à testemunha, com redução de mais de 50% com uso do ASM e mais de 60% com a harpina. Resultados semelhantes foram encontrados por Danner et al. (2008), que observaram redução das lesões e da esporulação de *Monilinia fructicola* em pêssegos tratados em pós-colheita com ASM e harpina. Capdeville et al. (2003) também observaram redução da incidência e severidade dos danos de *Penicillium expansum* em maçãs tratadas em pré e pós-colheita com harpina. Além disso, Mazaro et al. (2008), com o uso de ASM em pré e pós-colheita de morangos, observaram redução da incidência da podridão causada por *Botrytis cinerea*.

Mesmo com a redução do desenvolvimento de *C. gloeosporioides* nas maçãs, todos os frutos foram

**Tabela 1.** Área lesionada, eficiência de controle e concentração de esporos em maçãs 'Royal Gala', tratadas e não tratadas com eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, submetidas à inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em pós-colheita<sup>(1)</sup>.

Elicidor	Área lesionada (cm <sup>2</sup> )	Eficiência de controle (%)	Concentração (Esporos x 10 <sup>4</sup> mL <sup>-1</sup> )
Testemunha	7,7a	-	97,5a
ASM	4,8ab	36,9	47,5b
Harpina	4,1b	45,9	36,5b
Média±desvio-padrão	5,5±1,9	41,4±14,1	60,5±29,3
CV (%)	20,6	35,7	15,8

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

acometidos pela podridão-amarga, em maior ou menor escala, o que depreciou sua qualidade para comercialização in natura. O desenvolvimento do fungo foi relativamente rápido, em razão das condições utilizadas no experimento, como alta concentração do inóculo ( $10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ), cultivar suscetível à doença (Royal Gala), temperatura alta ( $24 \pm 4^\circ\text{C}$ ) e formação de câmara úmida. Capdeville et al. (2003) verificaram que o grau de proteção resultante da resistência sistêmica adquirida, eliciada por harpina em maçãs, variou de acordo com a concentração do eliciador e do inóculo do fungo *P. expansum*, com o intervalo de tempo entre a aplicação do eliciador e a inoculação do fungo e com o genótipo utilizado. Além disso, estes autores detectaram maior efeito de indução de resistência sistêmica em macieiras tratadas em pré-colheita, em comparação ao tratamento pós-colheita das maçãs.

Não houve diferenças significativas entre a testemunha e os eliciadores quanto ao teor de compostos do metabolismo primário (açúcares totais, açúcares redutores e proteínas) e do metabolismo secundário (fenóis totais) (Tabela 2).

A enzima fenilalanina amônia-liase não foi influenciada significativamente pela aplicação

dos eliciadores, o que é coerente com o resultado da quantificação de fenóis totais, pois a produção de compostos fenólicos é dependente da ativação desta enzima (Danner et al., 2008; Gholizadeh & Kohnhrouz, 2010). Observou-se que os eliciadores ASM e harpina tiveram valores numericamente maiores em comparação à testemunha, no que se refere à atividade das enzimas do estresse oxidativo: superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Uma exceção foi a enzima ascorbato peroxidase que, nas maçãs tratadas com harpina, foi numericamente menor do que na testemunha. Houve diferença significativa entre os tratamentos apenas quanto à atividade da enzima peroxidase, para a qual o eliciador harpina proporcionou maior atividade em comparação à testemunha e ao eliciador ASM. Embora o eliciador ASM não tenha tido efeito significativo em relação à testemunha, o valor numérico de atividade da POD foi três vezes maior (Tabela 3).

Não foi detectada diferença significativa entre os frutos tratados e não tratados com eliciadores quanto à atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, provavelmente, pelo fato de a atuação das enzimas já estar reduzida no momento da avaliação (72 horas após

**Tabela 2.** Teores de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas e fenóis totais de maçãs 'Royal Gala', tratadas e não tratadas com eliciadores acibenzolar-S-metilico (ASM) e harpina, submetidas à inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em pós-colheita.

Elicificador	Açúcares totais	Açúcares redutores	Proteínas	Fenóis totais
	-----( $\text{mg g}^{-1}$ )-----			
Testemunha	2,65 <sup>ns</sup>	0,0026 <sup>ns</sup>	3,41 <sup>ns</sup>	4,44 <sup>ns</sup>
ASM	3,29	0,0023	3,14	5,51
Harpina	2,95	0,0033	3,90	4,37
Média±desvio-padrão	2,96±1,0	0,0027±0,0007	3,48±1,0	4,77±0,84
CV (%)	25,2	20,2	15,8	15,8

<sup>ns</sup>Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Atividade catalítica de enzimas do metabolismo secundário de maçãs 'Royal Gala', tratadas e não tratadas com eliciadores acibenzolar-S-metilico (ASM) e harpina, submetidas à inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em pós-colheita<sup>(1)</sup>.

Elicificador	PAL ( $\text{kat kg}^{-1} \times 10^{-9}$ )	SOD ( $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ )	CAT	POD ( $\mu\text{kat } \mu\text{g}^{-1} \times 10^{-4}$ )	APX
	-----				
Testemunha	1,27 <sup>ns</sup>	108,6 <sup>ns</sup>	16,4 <sup>ns</sup>	0,82b	0,46 <sup>ns</sup>
ASM	2,19	129,7	24,6	2,47b	0,61
Harpina	0,54	133,6	23,0	5,76a	0,15
Média±desvio-padrão	1,33±0,58	124,0±50,9	21,3±8,4	3,02±0,89	0,41±0,18
CV (%)	47,5	46,4	43,5	33,0	53,5

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>ns</sup>Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade. PAL, fenilalanina amônia-liase; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; POD, peroxidase; APX, ascorbato peroxidase.

a inoculação do fungo e 84 horas após a aplicação dos eliciadores e de ferimentos nos frutos).

Assim, o aumento da atividade da enzima peroxidase foi o principal efeito de indução da resistência sistêmica verificado no presente trabalho. Isto explica a redução da área lesionada e da esporulação de *C. gloeosporioides*, pois a peroxidase atua na síntese de compostos fenólicos que são diretamente tóxicos aos fungos, como os ácidos clorogênico, cafeico e ferúlico, e na síntese de lignina, a qual fortalece as paredes celulares e serve de barreira física ao avanço da infecção do fungo nas células vizinhas àquelas infectadas (Hsu & Kao, 2003; Resende et al., 2003; Campos et al., 2004).

Danner et al. (2008) atribuíram a redução da área lesionada em pêssegos e da esporulação do fungo *M. fructicola* à atividade da fenilalanina amônia-liase. Esta enzima desempenha um papel-chave na biossíntese de fenilpropanoides, por catalisar a desaminação da L-fenilalanina para ácido transcinâmico. Em consequência, ocorre a síntese de fitoalexinas e lignina, fenol que confere maior resistência à parede celular, o que dificulta a entrada de fungos (Gholizadeh & Kohnehrouz, 2010). Além de terem estudado frutos e o fungo diferentes dos utilizados no presente trabalho, Danner et al. (2008) avaliaram os pêssegos 60 horas após a inoculação de *M. fructicola*, enquanto no presente trabalho as maçãs foram avaliadas 72 horas após a inoculação de *C. gloeosporioides*. Isto pode explicar os diferentes resultados encontrados quanto ao metabolismo primário e secundário dos frutos, uma vez que pode ter havido aumento dos compostos e enzimas eliciados por ASM e harpina, anteriormente ao momento da avaliação das maçãs.

Felipini & Di Piero (2009) constataram redução das lesões por *C. acutatum* (também causador da podridão-amarga), em frutos da cultivar de maçã Fuji, submetidos à imersão em soluções com diferentes concentrações de quitosana, em pós-colheita. Segundo os autores, a quitosana não aumentou a atividade da enzima peroxidase em maçãs, mas reduziu a severidade da doença nos frutos, a germinação dos conídios e o crescimento micelial do fungo. Liu et al. (2007) observaram que a quitosana afetou a integridade da membrana plasmática das células dos fungos *P. expansum* e *B. cinerea*, com consequente redução da germinação de conídios.

Os eliciadores harpina e, em menor grau, o ASM podem ser utilizados no manejo integrado da podridão-amarga em maçãs, uma vez que reduzem o desenvolvimento do fungo *C. gloeosporioides* em pós-colheita. Este efeito foi resultante, principalmente, do aumento da atividade da enzima peroxidase, que caracterizou a ocorrência da indução de resistência sistêmica adquirida.

Sugere-se que futuros estudos procurem potencializar os efeitos da harpina pelo uso na pré-colheita da macieira, conforme Capdeville et al. (2003), e pela aplicação conjugada de quitosana, outro eliciador que mostrou efeito de indução da resistência sistêmica e controle de *C. gloeosporioides* em pós-colheita de maçãs (Felipini & Di Piero, 2009).

## Conclusão

A harpina e, em menor grau, o acibenzolar-S-metílico, aplicados em pós-colheita de maçãs da cultivar Royal Gala, proporcionam aumento da atividade da enzima peroxidase e consequente redução da esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* e da área lesionada pelo fungo no fruto.

## Referências

- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1331-1341, 2002. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1331.
- BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: A CULTURA da macieira. Florianópolis: Epagri, 2002. p.527-555.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Acibenzolar-S-metílico**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/34370680474588c09281d63fbc4c6735/Microsoft+Word+-+A38++Acibenzolar-S-Met%C3%ADlico.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 8 set. 2012.
- CAMPOS, Â.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇAO, N.; SILVEIRA, E.P. da; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.637-643, 2004. DOI: 10.1590/S0100-204X2004000700004.
- CAPDEVILLE, G. de; BEER, S.V.; WATKINS, C.B.; WILSON, C.L.; TEDESCHI, L.O.; AIST, J.R. Pre- and post-harvest harpin

- treatments of apples induce resistance to blue mold. **Plant Disease**, v.87, p.39-44, 2003. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.1.39.
- 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**, v.56, p.3129-3136, 2005. DOI: 10.1093/jxb/eri310.
- DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESI, J.A.; MAZARO, S.M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.793-799, 2008. DOI: 10.1590/S0100-204X2008000700002.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.185-209, 2004. DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.
- FELIPINI, R.B.; DI PIERO, R.M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1591-1597, 2009. DOI: 10.1590/S0100-204X2009001200005.
- GHOLIZADEH, A.; KOHNEHROUZ, B.B. Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt-challenged maize leaves. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.217-223, 2010. DOI: 10.1590/S1677-04202010000400001.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977. DOI: 10.1104/pp.59.2.309.
- GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.121, p.233-242, 2008. DOI: 10.1007/s10658-007-9251-4.
- HSU, S.-Y.; KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003. DOI: 10.1023/A:1021830926902.
- JALALI, B.L.; BHARGAVA, S.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defense responses. **Journal of Phytopathology**, v.154, p.65-74, 2006. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2006.01073.x.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.
- LIU, L.; TIAN, S.; MENG, X.G.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.44, p.300-306, 2007. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2006.12.019.
- MARCHESI, 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**, v.46, p.501-505, 2008. DOI: 10.1007/s11099-008-0085-x.
- MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; MAY DE MIO, L.L.; BIASI, L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTEREHL, C.K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.185-190, 2008. DOI: 10.1590/S0100-29452008000100034.
- MERIGA, B.; REDDY, B.K.; RAO, R.; REDDY, L.A.; KISHOR, P.B.K. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oriza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.63-68, 2004. DOI: 10.1078/0176-1617-01156.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F.V. Reactive oxygen gene network of plant. **Trends in Plant Science**, v.9, p.490-498, 2004. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.08.009.
- NOZELLA, E.F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. 58p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.123-130, 2003. DOI: 10.1590/S0100-41582003000200001.
- RIZZON, L.A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.750-756, 2005. DOI: 10.1590/S0101-20612005000400020.
- SILVA, F. de A.S. e; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, p.71-78, 2002.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Biopesticide regulatory action document: Harpinab protein (PC Code 006506)**. Washington: Environmental Protection Agency Office, 2005. 22p.
- ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v.40, p.779-784, 1965. DOI: 10.1104/pp.40.5.779.

Recebido em 23 de setembro de 2012 e aprovado em 18 de fevereiro de 2013