

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

**CONTROLE DE *Colletotrichum lindemuthianum* NA CULTURA DO FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*) PELO EXTRATO DO COGUMELO *Pycnoporus sanguineus***

LINDOMAR ASSI

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ - BRASIL

SETEMBRO DE 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

CONTROLE DE *Colletotrichum lindemuthianum* NA CULTURA DO FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*) PELO EXTRATO DO COGUMELO *Pycnoporus sanguineus*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Mestrado, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ - BRASIL

SETEMBRO DE 2005

**A Deus Uno e Trino,
Onipotente e às pessoas que
amo, dedico.**

AGRADECIMENTOS

À minha família, nas pessoas de meu pai Evelasio e mãe Leocadia, pelo amor e dedicação inigualável, a irmã Lijandri Assi, ao cunhado Enomar Salome Heck, a sobrinha e afilhada Letícia, pelo apoio e incentivo em todos momentos da minha vida.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, em especial a coordenação do programa de pós-graduação de Agronomia, pela oportunidade de realizar este curso.

A todos os professores, dos quais tive a honra de ser aluno, pelos ensinamentos e valiosa convivência, ao orientador professor Dr. ^o José Renato Stangarlin pela orientação e virtudes que o tornam uma pessoa extraordinária.

À minha esposa Celoir, pelo carinho, dedicação e nobres sentimentos que a tornam única, a meus filhos Eduarda e Vitor que souberam compreender a falta do pai ao longo deste curso de Pós-graduação.

Aos colegas e amigos, Gilmar Franzener, Alexandra Franzener, Cinthia Röder pela convivência e grande amizade, e a todas as pessoas que me auxiliaram de alguma forma na realização deste trabalho.

A Deus, pelo dom da vida, e por se manifestar continuamente, agradeço.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em presença de extrato aquoso de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	38
Tabela 2. Inibição da germinação de esporos <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em presença de extrato aquoso de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	39
Tabela 3. Severidade de antracnose causada por <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em feijoeiro tratado com extrato aquoso (EA) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	40
Tabela 4. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para antracnose causada por <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em feijoeiro em função do tratamento com extrato aquoso (EA) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	41
Tabela 5. Atividade e atividade específica de peroxidase em feijoeiro tratado com extrato aquoso de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (EA) e inoculado com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões características da antracnose em superfície da folha (A) e vagem (B).	19
Figura 2. Basidiocarpos de <i>P. sanguineus</i>	28
Figura 3. Escala diagramática para antracnose do feijoeiro.....	34
Figura 4. Atividade e atividade específica de peroxidase em feijoeiro tratado com extrato aquoso (EA) de <i>P. sanguineus</i> na 7ª folha e inoculado ou não com <i>C. lindemuthianum</i> nas 7ª e 8ª folhas. A e C referem-se às atividades na 7ª folha. B e D referem-se às atividades na 8ª folha. A seta indica o momento da inoculação no 3º dia após o tratamento. Água(-□-); água + inoculação (-■-); EA a 20% (-□-); EA a 20% + inoculação (-●-). Atividade expressa em unidade enzimática (U.E.) por minuto de reação por grama de peso fresco (g.p.f.) ou por mg de proteínas.	43

RESUMO

A preocupação com o ambiente e a saúde humana tem incentivado a busca por métodos que reduzam o uso de fungicidas no controle de fitopatógenos. Considerando-se os vários resultados positivos já alcançados pela utilização da resistência induzida, bem como a grande demanda de novos eliciadores de resistência a fitopatógenos, este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito fungitóxico *in vitro* do extrato aquoso (EA) de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*, sobre *Colletotrichum lindemuthianum*; e avaliar em de casa de vegetação, o controle da antracnose em feijoeiro por esses extratos, bem como a indução de resistência pela determinação da atividade de peroxidase. Para os ensaios *in vitro* foram utilizados EAs, nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 %, autoclavados ou esterilizados por filtração, avaliando-se o crescimento micelial e a germinação de esporos de *C. lindemuthianum*. Para os ensaios *in vivo*, EAs não autoclavados a 5, 10 e 20% foram aplicados nas 7^{as} folhas de plantas de feijoeiro três dias antes da inoculação do patógeno (5×10^4 conídios /mL) que ocorreu nas 7^{as} e 8^{as} folhas. Água e fungicida azoxystrobin (0,6 g. p. c. / L) foram utilizados como testemunhas. Para a dosagem de peroxidase foram amostradas as 7^{as} e 8^{as} folhas no momento dos tratamentos e após três, seis, nove e doze dias. Os resultados indicaram atividade antimicrobiana direta dos EAs de *P. sanguineus*, com inibição de até 96% da germinação *in vitro* dos conídios de *C. lindemuthianum*, independente da autoclavagem ou não dos extratos. Os EAs estimularam em até 34 % o crescimento micelial. Nas plantas, apenas o EA a 20% controlou a antracnose, com redução de 70% na severidade na 7^a folha (tratada e inoculada), enquanto que para o fungicida

a redução foi de 73%. Para a 8ª folha (apenas inoculada), os EAs a 5, 10 e 20% reduziram a severidade em 58, 64 e 68%, respectivamente, enquanto que para o fungicida a redução foi de 74%. Essa redução na severidade pode estar associada com a atividade de peroxidase, a qual se apresentava alta, tanto na 7ª quanto na 8ª folha, no momento da inoculação, ou seja, três dias após o tratamento. Estes resultados indicam o potencial de controle da antracnose em feijoeiro pelo extrato de *P. sanguineus*, que pode ocorrer por atividade antimicrobiana direta e/ou indução de resistência local e sistêmica.

ABSTRACT

The concern with the environment and the human health has stimulated the search for methods that reduce the use of fungicides in the control of phytopathogens. Considering many positive results already reached by using induced resistance, and the great demand for new elicitors of resistance to pathogens, this work had the objective to evaluate the fungitoxic effect *in vitro* of the aqueous extract (EA) of *Pycnoporus sanguineus* basidiocarp, against *Colletotrichum lindemuthianum* and evaluate under greenhouse conditions, the control of anthracnose in beans, as well as the induction of resistance by the determination of peroxidases activity. For the assays *in vitro* were used EAs, in the concentrations of 1, 5, 10, 15 and 20 %, autoclavated or not. And evaluating the micelial growth and spores germination of *C. lindemuthianum*. For the *in vivo* assays, EAs not autoclavated at 5, 10 and 20% were sprayed in 7ths leaves of beans plants three days before the inoculation of the pathogen (5×10^4 conidia/mL) that was occurred in 7ths and 8ths leaves. Water and fungicide (azoxystrobin 0,6 g. p. c./L) were used as control treatments. For peroxidase, 7ths and 8ths leaves were sampled at the moment of treatments and after three, six, nine and twelve days. The results showed direct antimicrobial activity of the EAs of *P. sanguineus*, with inhibition of up to 96% of the germination *in vitro* of the spores of *C. lindemuthianum*, independent of the autoclavation of the extracts. The EAs stimulated in up to 34 % the micelial growth. In the plants, eA 20% controlled the anthracnose with reduction of 70% severity in 7ths leaf (treated and inoculated), while for the fungicide the reduction was of 73%. For 8ths leaf (only inoculated), the EAs at 5, 10 and 20% reduced the severity in 58, 64 and 68%,

respectively, while for the fungicide the reduction was of 74%. This reduction in severity can be associated with the activity of peroxidase, which was presented high, in both 7th's and 8th's leaves in the moment of the inoculation, it means, three days after the treatment. These results indicate the *P. sanguineus* extracts potential for control of anthracnose in beans plants, that can occur by direct antimicrobial activity and/or local and systemic induction.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 A cultura do feijoeiro.....	15
2.2 Doenças do feijoeiro.....	16
2.2.1 Antracnose	17
2.2.1.1 Sintomatologia	18
2.2.1.2 Etiologia.....	19
2.2.1.3 Epidemiologia	20
2.2.1.4 Controle	21
2.3 Controle alternativo de doenças.....	22
2.3.1 Mecanismos de defesa da planta.....	23
2.3.1.1 Peroxidase.....	25
2.3.2 Potencial de extratos de cogumelos no controle de doenças de plantas..	26
2.3.2.1 Pycnoporus sanguineus	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Obtenção de <i>C. lindemuthianum</i>	30
3.2. Obtenção do extrato bruto aquoso (EB) de <i>P. sanguineus</i>	30

3.3. Ensaio <i>in vitro</i>	31
3.3.1. Inibição do crescimento micelial e da esporulação de <i>C. lindemuthianum</i>	31
3.3.2 Inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>C. lindemuthianum</i>	32
3.4 Ensaio <i>in vivo</i>	33
3.5 Determinação da atividade de peroxidase	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1 Experimento <i>in vitro</i>	37
4.1.1 Inibição de crescimento micelial.....	37
4.1.2 Inibição da germinação de esporos	38
4.2 Experimento <i>in vivo</i>	39
4.3 Dosagem de peroxidases.....	42
5 CONCLUSÃO	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de feijão sendo também o maior consumidor. As regiões produtoras têm encontrado vários problemas relacionados à baixa produtividade, com valores inferiores a 600 Kg.ha⁻¹, que provavelmente têm suas causas nos métodos culturais inadequados, nas variações climáticas, principalmente na deficiência hídrica, além dos problemas fitossanitários. O grande número de doenças que afetam a cultura é o maior responsável pelo baixo rendimento, com danos causados por fungos, bactérias, vírus e nematóides, sendo maiores ou menores em função de fatores abióticos relacionados à planta.

Uma das mais severas doenças fúngicas do feijoeiro é a antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum*. A antracnose é endêmica nas regiões tradicionais da cultura e tem sua condição de severa infecção relacionada à alta umidade do ar e temperaturas amenas. Além de diminuir o rendimento da cultura, a antracnose deprecia a qualidade do produto por ocasionar manchas nos grãos e vagem, prejudicando a sua comercialização e, às vezes, tornando-os impróprios para o consumo.

O controle da antracnose do feijoeiro pode ser feito com cultivares resistentes. No entanto, a falta de cultivares com alto grau de resistência e adaptadas às diferentes regiões de cultivo, aliada à grande variabilidade patogênica apresentada por *C. lindemuthianum*, dificultam o controle apenas por este método, conduzindo à necessidade de aplicação de fungicidas. O uso racional desses

produtos pode ter, a curto prazo, um efeito positivo para o produtor. No entanto, a longo prazo, além da seleção de isolados dos patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos, devido à poluição causada pelos resíduos. No caso do feijão produzido em sistema orgânico de cultivo, o controle torna-se ainda mais difícil em função da impossibilidade do uso de fungicidas tradicionais.

Desta forma, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas contra as doenças e, uma das alternativas que tem demonstrado resultados promissores, é a indução de resistência em plantas, que consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta.

A indução de resistência em plantas a patógenos pode ser conseguida com a aplicação de produtos de origem biótica (como fragmentos de células de leveduras ou de cogumelo e extratos de plantas medicinais) ou de origem abiótica (como produtos derivados do ácido salicílico). A indústria de defensivos tem atentado para essa tendência e tem desenvolvido moléculas capazes de induzirem mecanismos de defesa nas plantas contra patógenos.

O desenvolvimento de métodos alternativos de controle, como o uso de produtos naturais com atividades antimicrobianas direta e/ou indutora de resistência, poderá contribuir para a redução dos danos causados pelas doenças, principalmente em áreas de cultivo orgânico.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método alternativo de controle da antracnose em feijoeiro pelo tratamento com extrato aquoso de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do feijoeiro

Dentre os gêneros e espécies de feijões, o Brasil é o segundo maior produtor do mundo, com a Índia ocupando o primeiro lugar, China em terceiro, Estados Unidos em quarto e México em quinto (Borém & Carneiro, 1998).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se no Brasil, como um dos produtos agrícolas da mais alta expressão econômica e social (Ramalho *et al.*, 1993). Constitui junto com o arroz, a base da alimentação do povo brasileiro, sobretudo nas classes de renda mais baixa (Vieira, 1998). A leguminosa constitui também uma importante fonte de proteína na dieta da população (Yokoyama *et al.*, 1996).

Devido a sua boa adaptação às mais variadas condições edafoclimáticas do Brasil, o feijoeiro faz parte da maioria dos sistemas produtivos dos pequenos e médios produtores, cuja produção é direcionada ao consumo familiar e à comercialização do excedente. Mais recentemente, o feijoeiro passou a ser cultivado também na época de inverno (período seco), sob irrigação, atraindo médios e grandes produtores (Vieira *et al.*, 1993).

No Paraná, a cultura do feijoeiro está distribuída em três safras distintas ao longo do ano. O centro-sul do Estado é responsável por 86% do total colhido, o qual é oriundo da safra das “águas” nos meses de setembro a novembro. Há ainda a

safras das “secas” de janeiro a março, e a de outono-inverno ou terceira época, nos meses de maio a julho. Destes, 70% são resultantes da região de Ponta Grossa e de Jacarezinho. Nas regiões Norte e Nordeste do Estado está concentrada a produção da safra do inverno, que representa apenas 2% da produção anual, devido à ocorrência de períodos de estiagem, baixas temperaturas e ataque de patógenos (Demarchi, 1997).

Tem-se constatado em nível de grandes produtores, rendimentos superiores a 2000 Kg.ha⁻¹ para cultivo em sequeiro e 3000 Kg.ha⁻¹ em cultivos irrigados, enquanto os pequenos produtores não conseguem sequer alcançar 1000 Kg.ha⁻¹. A grande diferença é que os grandes produtores procuram incessantemente a pesquisa, demandando tecnologias, enquanto o pequeno, pela sua própria condição sócio-econômica, não tem condições de acesso as tecnologias nem tão pouco podem contar com um forte serviço de assistência técnica e extensão rural para ajudá-los a incorporar as novas tecnologias aos sistemas de produção (Del Peloso *et al.*, 1997).

Tanto excesso quanto a falta de chuvas são prejudiciais aos feijoeiros, podendo causar danos durante os estádios vegetativos e/ou reprodutivos. Temperaturas fora dos limites de 18 a 30 °C também podem afetar a produção do feijoeiro, reduzindo-a (Silva, 1996).

2.2 Doenças do feijoeiro

As doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro constituem uma das principais causas da sua baixa produtividade no Brasil. Muitas doenças podem

causar, dependendo das condições de ambiente, danos totais na produção ou, então, dependendo do nível de contaminação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (Paula Junior & Zambolim, 1998).

A seguir são citadas as doenças tradicionalmente importantes para a cultura do feijoeiro no Brasil:

- a. Doenças causadas por vírus: mosaico-amarelo, mosaico-anão, mosaico comum, mosaico-dourado;
- b. Doenças causadas por bactérias: crestamento bacteriano;
- c. Doenças causadas por nematóides: galha das raízes;
- d. Doenças causadas por fungos: antracnose, ferrugem, mancha angular, podridões radiculares (Vieira, 1998).

2.2.1 Antracnose

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib. é uma das mais severas doenças que atacam o feijoeiro (Augustin e Costa, 1971). Pode provocar reduções na produção de até 100%, além de depreciar a qualidade do produto (Dalla Pria et al., 1999).

A sobrevivência de *C. lindemuthianum*, conforme Bianchini *et al.* (1997), acontece de um ano para o outro em restos de cultura e em sementes. As sementes infectadas externamente por conídios, ou internamente pelo micélio dormente, causam lesões nos cotilédones que atuam como fonte de inóculo secundário. As sementes constituem, portanto, um meio eficaz de transmissão do patógeno, a longas distâncias, ou de plantio a outro. Por outro lado, em curtas distâncias, a

transmissão é realizada por meio das chuvas e de implementos agrícolas que entram em contato com a planta de feijoeiro contaminada. Também o homem e diversos insetos que visitam as plantas doentes podem disseminar os esporos aderidos aos corpos.

Segundo Vieira *et al.* (1993), uma substância gelatinosa cerca os esporos, provocando-lhes aderência a tudo que neles toca. O desenvolvimento da doença é favorecido em temperaturas que variam de 15 a 22 °C e em condições de alta umidade (Paula Jr. e Zambolim, 1998).

2.2.1.1 Sintomatologia

A doença pode afetar toda a parte aérea do feijoeiro. Durante a germinação, sementes infectadas produzem lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo, podendo causar podridão de colo da planta. Em caules mais velhos, as lesões chegam a atingir 5-7 mm de comprimento (Rava & Sartorato, 1994).

As lesões ocorrem com maior frequência nos pecíolos, na superfície inferior das folhas e nas nervuras. As lesões características, de coloração marrom-escura ou parda, são observadas ao longo das nervuras da face inferior da folha. A infecção atinge tanto as nervuras principais como as secundárias (Figura 1 A). Às vezes as lesões podem ser vistas na face superior das folhas, quando então uma região clorótica se desenvolve ao lado das manchas necróticas e as folhas tendem a curvar-se para baixo, em casos de infecção severa (Dalla Pria *et al.*, 1999).

A antracnose é reconhecida mais facilmente nas vagens, onde os sintomas são mais definidos (Figura 1 B). Nestas, as lesões são arredondadas, deprimidas, de

tamanho variável, apresentando o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante que geralmente se acha rodeado por um bordo de coloração café-avermelhada (Rava & Sartorato, 1994).

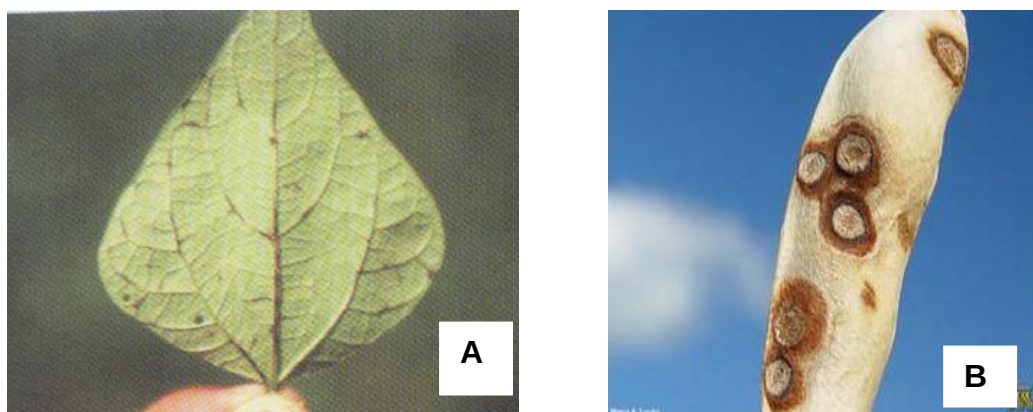


Figura 1. Lesões características da antracnose em superfície da folha (A) e vagem (B).

A esporulação pode ocorrer em lesões nos pecíolos, nervuras principais e vagens. O centro dessas lesões torna-se descolorido e durante períodos de baixa temperatura e alta umidade, os conídios são produzidos numa matriz gelatinosa que escurece quando seca (Dalla Pria et al., 1999).

2.2.1.2 Etiologia

A antracnose do feijoeiro é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. A fase perfeita corresponde ao ascomiceto *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. Este fungo é patogênico também a outras espécies de leguminosas como *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *Vigna unguiculata* e *Vicia faba* (Bianchini et al., 1997).

O fungo tem hifa septada e ramificada e sua coloração, à medida que envelhece, varia de hialina a quase negra. Os conídios são hialinos, unicelulares, oblongos a cilíndricos, apresentando as extremidades redondas ou uma delas pontiagudas. Os conídios medem de 2,5-5,5 x 11-20 μm e podem apresentar uma área clara semelhante a um vacúolo central. A massa de esporos formada nos acérvulos possui coloração rósea ou salmão. Os conidióforos são hialinos, eretos, sem ramificações, com comprimento de 40 a 60 μm . Os acérvulos são providos de setas que se desenvolvem sobre uma massa estromática. As setas podem, às vezes, ser encontradas no hospedeiro e quase sempre em meio de cultura. Apresentam dimensões de 4-9 x 30-100 μm , são marrons e septadas (Rava & Sartorato, 1994).

C. lindemuthianum apresenta grande variabilidade patogênica, com mais de 30 raças já identificadas na América Latina (Bianchini *et al.*, 1997).

2.2.1.3 Epidemiologia

O patógeno *C. lindemuthianum* sobrevive de uma estação para outra e pode ser disseminado pela semente e respingos de chuva (Rava & Sartorato, 1994).

Os conídios que atingem a superfície das plantas podem germinar em 6 – 9 dias, formando um a quatro tubos germinativos e apressório. Este se prende a superfície dos hospedeiros, pela sua camada gelatinosa. A pressão mecânica exercida pelo apressório faz com que a penetração ocorra pela cutícula e epiderme (Dalla Pria *et al.*, 1999).

Após a penetração, esta hifa aumenta de tamanho e cresce entre as paredes celulares e o protoplasto, sem desenvolver sintomas por dois a quatro dias (Rava & Sartorato, 1994).

As células são degradadas enzimaticamente, levando ao surgimento de lesões aquosas que escurecem devido à alta concentração de tanino. O micélio se agrega dentro das lesões, formando os acérvulos, que rompem a cutícula do hospedeiro.

Os conídios são formados dentro de uma matriz gelatinosa e servem como inóculo para infecção secundária (Dalla Pria et al., 1999).

2.2.1.4 Controle

As principais táticas ou medidas de controle são a resistência horizontal, controle químico, rotação de culturas, tratamento de sementes e essas vinculadas com a época de semeadura.

Segundo Gianasi (2002), entre as estratégias para o controle da antracnose, a utilização da resistência genética é considerada prioritária em programas de melhoramento. Entretanto, a dificuldade de incorporar em um único genótipo resistência para os principais patótipos do agente causal dessa enfermidade justifica a necessidade da utilização de outros recursos.

Na agricultura moderna, as doenças fúngicas de plantas têm sido controladas principalmente através do uso de fungicidas. Entretanto, as pesquisas indicam que mesmo com o aumento expressivo do uso de agrotóxicos, as perdas atribuídas a doenças e pragas não sofreram uma redução drástica e os ganhos de produtividade não foram significativos (Fiori-Tutida, 2003).

As constantes preocupações com o ambiente e a saúde humana têm levado muitos pesquisadores a investigar algumas alternativas visando redução do uso de fungicidas com resultados promissores no controle de fitopatógenos em diversas culturas. O uso de extratos de microrganismos e produtos oriundos do seu metabolismo é uma prática que vem sendo bastante pesquisada em alguns patossistemas.

2.3 Controle alternativo de doenças

Controle alternativo é o controle de doenças, o qual inclui o controle biológico, a indução de resistência em plantas (Moraes, 1992) e o uso de extratos naturais com propriedades antimicrobianas e ou indutores de resistência (Schwan-Estrada *et al.*, 2003).

O controle biológico pode ser definido como o controle de um microrganismo antagonico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (Cook & Baker, 1983).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos (como microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos, como ácido aminobutírico (Cohen, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (Hijwegwn *et al.*, 1996) e Bion[®] (Resende *et al.*, 2001). Esses mecanismos de resistência podem incluir o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (como β -1,3 glucanase, quitinase e peroxidase) (Pascholati, 1998). Moléculas de origem biótica ou abiótica,

capazes de ativar / induzir qualquer resposta de defesa nas plantas, são chamadas de elicitores (Smith, 1996).

A expressão “indução de resistência” tanto pode ser utilizada para designar uma proteção local, isto é, a indução de uma resistência apenas nos tecidos em que foi realizado o tratamento com o agente indutor, como pode indicar uma resistência sistêmica que se manifesta à distância do local onde foi aplicado o agente indutor (Moraes, 1992).

A proteção conferida pelo tratamento é capaz de proteger a planta contra infecções subseqüentes por diferentes patógenos (Kuc, 1995). Além disso, a indução de resistência mostra-se como uma estratégia potencial para o controle fitossanitário (Lyon *et al.*, 1995). A resistência induzida tem sido verificada em diversas plantas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas (Schneider *et al.*, 1996).

A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e a subseqüente inoculação do patógeno (tratamento desafiador) (Pascholati & Leite, 1995). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias, são importantes no fenômeno da resistência induzida.

2.3.1 Mecanismos de defesa da planta

A resistência do hospedeiro a uma doença pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subseqüente atividade de um patógeno nos tecidos da mesma (Goodman *et al.*,

1986). Para atingir esse objetivo a planta utiliza-se de fatores de resistência ou mecanismos de defesa divididos em duas categorias: pré-formados, presentes na planta antes do contato com o patógeno, e pós-formados, que se mostram ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno (Misaghi, 1982). Segundo Pascholati & Leite (1994, 1995) esses mecanismos compreendem, por exemplo:

A. Pré-formados (também denominados passivos ou constitutivos):

- a) estruturais: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;
- b) bioquímicos: fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fototoxinas, quitinases e β -1,3 glucanases;

B. Pós-formados (também denominados ativos ou induzíveis):

- a) estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses;
- b) bioquímicos: fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese.

A seqüência de eventos relacionados a indução e expressão da resistência ou resposta de defesa inicia-se com o reconhecimento pelo hospedeiro de alguma característica química ou estrutural do patógeno, ou agente de estresse ou dano associado com a invasão. Esta percepção resulta na produção ou liberação de um composto sinalizador que é responsável pela indução da resposta de defesa da planta (Johal *et al.*, 1995).

Um dos mais eficientes mecanismos de defesa é a reação de hipersensibilidade, onde há a indução da produção de fitoalexinas e de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta (Stintzi *et al.*, 1993), resultando

na morte repentina de um número limitado e células do hospedeiro em torno dos sítios de infecção (Pascholati & Leite, 1995).

Os mecanismos ativos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves, como a peroxidase, nos metabolismos primário e secundário (Fric, 1976)¹ *apud* (Vigo-Schultz, 2004).

2.3.1.1 Peroxidase

A enzima peroxidase e suas isoformas participam de vários processos fisiológicos de grande importância, catalisando a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina, um importante mecanismo físico de defesa vegetal (Gaspar *et al.*, 1982).

Essas enzimas participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno (Isigue *et al.*, 1993), da oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam-se em resposta a infecção (Fry, 1986), oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) e na biossíntese de lignina (Hoagland, 1990).

As peroxidases (doador: H₂O₂ Oxiredutase, E.C. 1.11.1.7) são específicas para o aceptor de hidrogênio, sendo ativos somente metil, etil e peróxidos, mas inespecíficas para os doadores de hidrogênio, que podem ser fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e muitos aminoácidos (Bergmeyer *et al.*, 1974).

¹Fric, F. Oxidative enzymes. In HEITEFFUS, R.; WILLIAMS, P.H. (Eds.) **Physiological Plant Pathology**, Berlin, Springer, 1976. p.617-631.

Mudanças na atividade das peroxidases têm sido freqüentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (Bonatti *et al.*, 1994). Com relação à biossíntese de lignina, um polímero complexo formado principalmente de unidades de fenilpropanóides, as peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina. Esse polímero, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração do patógeno (Pascholati & Leite, 1994). A lignificação pode impedir o desenvolvimento do patógeno nos tecidos vegetais através de várias maneiras: a) estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e ao crescimento do patógeno; b) modificação da parede celular tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas; c) aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos e impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor.

2.3.2 Potencial de extratos de cogumelos no controle de doenças de plantas

Ainda são escassos os trabalhos que têm utilizado os cogumelos para o controle de doenças em plantas, porém os estudos realizados até o momento têm apresentado resultados animadores, demonstrando a importância dos cogumelos no mercado mundial, não apenas atribuído ao seu valor nutricional, mas também às possíveis aplicações na área médica e industrial e, mais recentemente, na área agrícola para o controle de doenças de plantas (Fiori-Tutida, 2003).

Pacumbaba et al. (1999) comprovaram a atividade inibitória de fluido de *Letinula edodes* em *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

Fiori-Tutida (2003) verificou, através dos extratos brutos dos cogumelos *L. edodes* e *Agaricus blazei*, potencial como eliciadores de respostas de defesa em plântulas, uma vez que estimularam a produção de fitoalexinas em soja e sorgo, indução de proteínas-PR (glucanase e peroxidase) em trigo e ativaram rotas metabólicas para a formação de papilas em mesocótilos de trigo.

Di Piero & Pascholati (2004) demonstraram redução parcial na severidade da antracnose em folhas de pepino pré-tratadas com os extratos de *L. edodes* e *A. blazei*, bem como sistemicamente. O efeito protetor foi dependente da concentração do extrato de cogumelo utilizada e, em menor grau, do intervalo de tempo entre indução-inoculação e o ambiente. De modo geral, os isolados de *L. edodes* foram um pouco mais eficientes que os de *A. blazei*. Os extratos aquosos de basidiocarpos dos diferentes isolados não inibiram o crescimento micelial e a germinação de esporos *in vitro* de *Colletotrichum lagenarium*. Por outro lado, o extrato de *L. edodes* (mistura dos isolados LE 96/17 e LE 96/22) provocou aumento nas atividades de quitinases e, principalmente, de peroxidases nas plantas tratadas.

2.3.2.1 *Pycnoporus sanguineus*

P. sanguineus um fungo do tipo saprófita de crescimento lento, pertencente a Divisão *Basidiomycota*, da família Poliporaceae, responsável pela decomposição de certos tipos de madeiras nas florestas. Destaca-se pela cor vermelho-alaranjada de seus basidiocarpos (Figura 2). Esse fungo há muito tempo é usado na África para o tratamento de várias enfermidades. Possui componentes para o tratamento de reumatismos, artrites e gota, possuindo ainda atividade antibacteriana e antifúngica. (<http://www.naturallist.com/medmushr.htm>).



Figura 2. Basidiocarpos de *P. sanguineus*.

Outras funções têm sido atribuídas a *P. sanguineus*. Zulfadhly et al. (2001) indicaram o uso desse basidiomiceto *P. sanguineus* para a remoção de metais pesados fixados na coluna do leito de rios. Além disso, a presença de ligninase, Mn-peroxidase e β -glucosidase, por exemplo, nesse fungo indica-o como potencial para uso industrial.

A atividade antimicrobiana de *P. sanguineus* tem sido conhecida desde 1946, quando Bose (1946)², *apud* Rosa et al. (2003) isolando poliporin, um

² Bose SR 1946. Antibiotics in a *Polyporus* (*Polystictus sanguineus*). *Nature* 158: 292-296.

composto ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e sem atividade tóxica para animais.

Shukla *et al.* (1996) demonstraram a ação antagonista de *P. sanguineus* contra *Ganoderma lucidum in vitro*. O fungo inibiu o crescimento de duas raças de *G. lucidum*, indicando-o como um agente potencial no controle biológico de microrganismos fitopatogênicos.

Smânia *et al.* (1995, 1998) estudaram um antibiótico produzido por *P. sanguineus*, mostrando que este basidiomiceto produziu cinabarina, um pigmento de cor laranja ativo contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e vários *Streptococcus spp.*. *B. cereus* e *L. plantarum* foram os microrganismos inibidos com a menor concentração de cinabarina (0,0625 mg.ml⁻¹), e *K. pneumoniae* foi a espécie menos sensível (>4,0 mg/ml⁻¹).

Rosa *et al.* (2003), avaliando basidiomicetos de 84 espécies de diferentes ecossistemas do Brasil, com atividade antifúngica e antibacteriana de microrganismos patogênicos e não patogênicos, verificaram que *P. sanguineus* inibiu o crescimento do fungo *Candida krusei* e das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de *C. lindemuthianum*

O patógeno *C. lindemuthianum* foi obtido a partir de sementes de feijão, variedade IAPAR 81, e o seu isolamento realizado através da técnica do papel do filtro com congelamento (Amaral, 1987). O patógeno multiplicado em meio de ágar-vagem (Benhamon *et al.*, 1991) e mantido por 14 dias sob fotoperíodo de 12 h, e temperatura de 20 °C.

3.2. Obtenção do extrato bruto aquoso (EB) de *P. sanguineus*

Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados nas matas da região Oeste do Paraná e, posteriormente, secos e moídos. O preparo dos extratos aquosos (EA) consistiu na hidratação do pó seco de basidiocarpos por 24 h à temperatura de 4 °C, na proporção de 14 mL de água destilada para 1 g de pó seco de basidiocarpo, sendo em seguida filtrados em papel de filtro Whatman nº 1 (Fiori-Tutida, 2003; Di Piero & Pascholati, 2004). Os filtrados coletados foram submetidos a uma nova filtragem de esterilização em sistema Milipore com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, em câmara de fluxo laminar. Esses filtrados foram armazenados em geladeira a 4 °C e utilizados, após diluições, nos testes de proteção de plantas.

3.3. Ensaios in vitro

3.3.1. Inibição do crescimento micelial e da esporulação de *C. lindemuthianum*

Em erlenmeyer contendo 100 mL de BDA, foram adicionadas alíquotas de EA de *P. sanguineus* de modo a se obter concentrações finais de 1, 5, 10, 15 e 20 %. Em seguida, este material foi submetido a autoclavagem à 121 °C e 1 atm, durante 20 min. O meio foi vertido em placas de Petri e um disco de micélio (0,5 cm) de *C. lindemuthianum*, retirado de uma cultura com 14 dias de idade, foi repicado para o centro das placas, ficando estas incubadas em BOD à 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Como testemunha foi utilizado somente BDA. Este procedimento também foi realizado para o extrato aquoso não autoclavado de *P. sanguineus*, somente esterilizado por filtração (membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro).

As avaliações foram efetuadas a cada três dias, medindo-se o diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) até o momento em que o fungo atingiu 2/3 da placa.

Ao término deste bioensaio foi avaliada a esporulação de cada uma destas colônias. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos, obtida pela adição de 10 mL de água destilada por placa, seguido de repicagem da colônia e filtração em gaze. O número de conídios / mL foi determinado com câmara de Neubauer ao microscópio óptico.

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e cinco tratamentos (1, 5, 10, 15 e 20%), além de uma testemunha absoluta (BDA).

3.3.2 Inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *C. lindemuthianum*

O teste da inibição da germinação de esporos e formação de apressórios na presença dos EA foi realizado em lâminas de microscopia revestida por delgada camada de ágar-água a 2% (800 µL por lâmina).

Alíquotas de 50 µL dos EA autoclavados ou não, corrigidas para se manter os mesmos valores das concentrações citadas em 4.3.1. e alíquotas de 50 µL da suspensão de esporos de *C. lindemuthianum* (1×10^4 conídios.mL⁻¹) obtidos de uma cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas. Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida sob luz fluorescente durante 24 h a 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Como testemunha foi utilizado água destilada esterilizada em substituição aos EA (Balbi-Peña, 2005).

Após 24 h foi adicionada uma alíquota de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos esporos. Foram utilizadas três lâminas por tratamento (Di Piero & Pascholati, 2002). O esporo foi considerado germinado quando o comprimento do seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e cinco tratamentos (1, 5, 10, 15 e 20%), além de uma testemunha absoluta (água).

3.4 Ensaios *in vivo*

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Marechal Cândido Rondon, no período de junho e julho de 2005. As plantas de feijoeiro (IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos (capacidade para 1,5 L) contendo uma mistura de solo e areia (proporção 2:1), e mantidas em cultivo protegido.

Os seguintes tratamentos foram realizados: a) testemunha ou controle negativo: plantas tratadas com água destilada; b) controle positivo: fungicida sistêmico azoxystrobin (0,6 g produto comercial por L de água), aplicado três dias antes da inoculação do patógeno; c) extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* em concentrações de 5, 10 e 20%, aplicados três dias antes da inoculação do patógeno.

Os extratos, em quantidade de 3 mL, foram aplicados na sétima folha trifoliada. A inoculação dos esporos de *C. lindemuthianum* (5×10^4 conídios.mL⁻¹), foi realizada na sétima folha trifoliada tratada, bem como na oitava folha trifoliada não tratada, para se observar a ocorrência de proteção local e/ou sistêmica, respectivamente. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos de polipropileno por 24 h (câmara-úmida).

A severidade da doença foi avaliada através do número de lesões nas 7ª e 8ª folhas no 8º, 12º e 19º dias após a inoculação (DAI), com o auxílio de uma escala diagramática. (Figura 3) (Dalla Pria *et al.*, 1999).

Com as avaliações de severidade da antracnose nas folhas, foram traçadas as curvas de progresso da doença. A partir das mesmas, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por meio da equação:

$$\text{AACPD: } \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) \times 0,5] [(t_{i+1} - t_i)], \text{ em que:}$$

n = número de avaliações;

y = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t = tempo no momento da i-ésima;

Neste ensaio utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos, além de dois controles, com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um vaso contendo duas plantas.

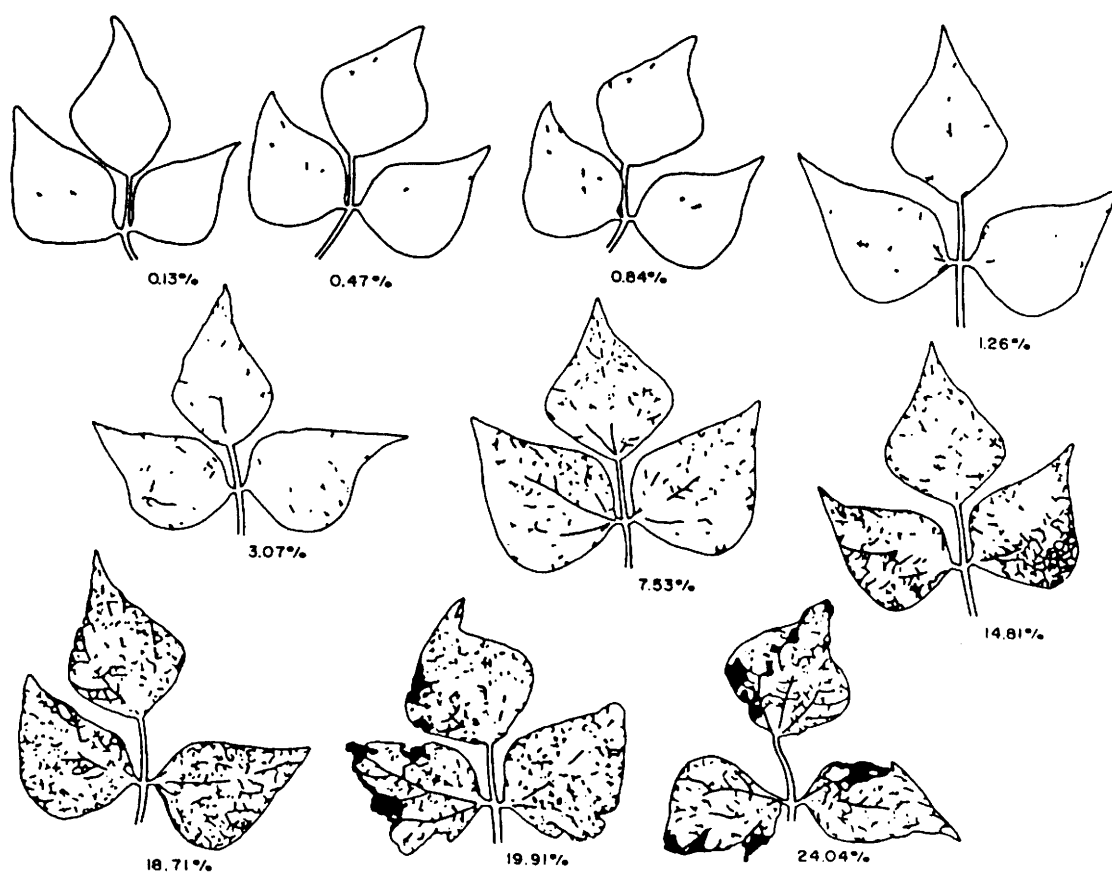


Figura 3. Escala diagramática para antracnose do feijoeiro.

3.5 Determinação da atividade de peroxidase

Para este ensaio foram utilizados os seguintes tratamentos: a) plantas tratadas com água na sétima folha verdadeira; b) plantas tratadas com água na sétima folha verdadeira e após três dias inoculadas com *C. lindemuthianum* (5×10^4 esporos/mL⁻¹) nas sétimas e oitavas folhas; c) plantas tratadas com extrato aquoso de basidiocarpos EA a 20% na sétima folha verdadeira; d) plantas tratadas com EA a 20% na sétima folha verdadeira e após três inoculadas com *C. lindemuthianum* (5×10^4 esporos/mL⁻¹) nas sétima e oitava folhas verdadeiras (Di Piero & Pascholati, 2004).

No momento dos tratamentos, e também no 3º, 6º, 9º e 12º dias, foram retiradas amostras foliares para determinação da atividade de peroxidase, utilizando-se para isto um furador de rolha com diâmetro de 7 mm. Cada amostra continha 10 discos que foram obtidos das sétimas e oitavas folhas de plantas de feijão. Imediatamente após a coleta os discos foram acondicionados em envelopes feitos com papel alumínio e mantidos em gelo, sendo posteriormente, congelados e armazenados a -20 °C. Foram coletadas três repetições por tratamento e por tempo de amostragem.

As amostras de tecido vegetal coletadas foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) (tampão de extração) em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 6.500 g durante 10 min. O sobrenadante obtido, considerado como fração contendo as peroxidases solúveis, foi congelado para posterior determinação da atividade enzimática. Todo o processo de extração das peroxidases foi conduzido a 4º C (Lusso & Pascholati, 1999). A atividade das peroxidases foi determinada a 30 °C, através de método

espectrofotométrico direto (Hammerschmidt *et al.*, 1982). A mistura da reação continha 2,9 mL de uma solução contendo 250 μ L de guaiacol puro e concentrado e 306 μ L de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão de extração. A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm. Os valores foram expressos em unidade enzimática U. E/ min/ mg de proteína para a atividade específica ou U. E/ min/ grama de peso fresco (g.p.f.) para atividade (Fiori-Tutida, 2003).

O teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de Bradford (1976). A mistura da reação continha três réplicas, sendo que para cada réplica foram utilizados, 800 μ L de preparação enzimática e 200 μ L de reagente o qual foi adicionado sob agitação. Após 5 min e realizou-se a leitura de absorbância de espectrofotômetro a 595 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Experimento *in vitro*

4.1.1 Inibição de crescimento micelial

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de *P. sanguineus* sobre o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* foi significativa apenas para o extrato não autoclavado. Esses extratos estimularam o crescimento micelial em até 48% (tabela 1). Não houve esporulação em nenhum dos tratamentos, incluindo a testemunha, provavelmente devido ao meio BDA usado neste ensaio, o qual não é adequado para a esporulação.

Blakeman e Flokkema (1982)³ *apud* Fiori Tutida (2003), verificaram que em ambientes onde há maior disponibilidade de nutrientes há um estímulo dos processos de germinação e esporulação. Hipótese semelhante foi observada por Di Piero e Pascholati (2002) ao trabalharem com cianobactérias. Os autores verificaram que as cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. não apresentaram efeito antagônico *in vitro* a *Colletotrichum sublineolum*. Pelo contrário, verificou-se estímulo do crescimento micelial do patógeno, após o tratamento com os filtrados de culturas obtidos a partir de cianobactérias.

³BLAKEMANN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, v.20, p. 167 – 192, 1982.

Os resultados indicaram que a quantidade e/ou qualidade de nutrientes presentes nos tratamentos foi a principal causa do estímulo do crescimento micelial de *C. sublineolum*.

Efeito semelhante pode estar ocorrendo neste trabalho com *C. lindemuthianum*.

Tabela 1. Crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum lindemuthianum* em presença de extrato aquoso de *Pycnoporus sanguineus*.

Tratamentos	Crescimento micelial (cm)	
	Extrato autoclavado	Extrato não autoclavado ¹
Extrato de <i>P. sanguineus</i> (%):		
1	5,20	5,13 NS ³
5	6,94	6,89 NS
10	5,08	7,38 (+)
15	4,88	7,02 NS
20	5,92	7,1 (+)
Testemunha ²	5,08	5,0
Equação de regressão	- ⁴	$Y = 5,011375 + 0,3655345 x - 0,01352931 x^{2**}$
R ²	-	0,9236
C.V.(%)	22	18

¹ Esterelizado por filtração em membrana millipore (0,45 µm diâmetro de poro);

² Apenas meio BDA;

³ NS: não significativo em relação à estemunha; (+) significativo e superior à testemunha.;

⁴ Não houve diferença significativa entre os tratamentos;

4.1.2 Inibição da germinação de esporos

Os EAs não autoclavados e autoclavados reduziram a germinação de esporos *in vitro* de *C. lindemuthianum*, alcançando inibições de até 96% (Tabela 2).

A inibição foi ligeiramente maior no extrato não autoclavado, sem caracterizar, no entanto, a presença de compostos termo-lábeis.

Tabela 2. Inibição da germinação de esporos *in vitro* de *Colletotrichum lindemuthianum* em presença de extrato aquoso de *Pycnoporus sanguineus*.

Tratamentos	Germinação de esporos (%)	
	Extrato autoclavado	Extrato não autoclavado ¹
Extrato de <i>P. sanguineus</i> (%):		
1	94	96
5	95	96
10	94	96
15	93	95
20	93	96
Água	0	0
C.V. (%)	2,64	2,45

¹ Esterelizado por filtração em membrana millipore (0,45 µm diâmetro de poro).

4.2 Experimento *in vivo*

A antracnose apresentou moderada severidade, determinada pelas inoculações realizadas com esporos do patógeno e favorecida pela suscetibilidade da cultivar e pela ocorrência de condições ambientais favoráveis à doença.

Na primeira avaliação da doença, 7ª folha, ao 8º dia após a inoculação (DAI), todos os tratamentos resultaram em severidade inferior á testemunha (água), (Tabela 3). Os tratamentos de EA a 5 e 10% apresentaram controle intermediário, enquanto que o tratamento de EA a 20% resultou em controle muito próximo ao do

fungicida embora, não se diferenciasssem estatisticamente. Isto pode indicar efeito de dose dependente das concentrações de EA. Nas avaliações posteriores, 12º DAI e 19º DAI os valores de severidade da antracnose foram mais elevados, porém, sempre inferiores á testemunha (água). Nas avaliações efetuadas na 8ª folha no 8 º DAI, os valores de severidade não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Para as avaliações nos 12º DAI e 19º DAI houve incremento nos valores de severidade, mas sempre inferiores à testemunha. Denota-se nesta 8ª folha, da mesma forma que na 7ª, um efeito de dose dependente do EAs. Os valores de severidade para os tratamentos com EAs foram muito próximos ao do fungicida, demonstrando que foram tão bons quanto este, embora não diferissem estatisticamente.

Tabela 3. Severidade de antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro tratado com extrato aquoso (EA) de *Pycnoporus sanguineus*.

Tratamentos ¹	Severidade da antracnose (%)					
	7ª Folha ²			8ª Folha ²		
	8 DAI ⁴	12 DAI	19 DAI	8 DAI	12 DAI	19 DAI
EA 5%	0,80 b ⁵	0,81 b	0,84 b	0,76 a	0,77 b	0,90 b
EA 10%	0,85 b	0,91 b	0,92 b	0,64 a	0,69 b	0,71 b
EA 20%	0,56 b	0,75 b	0,78 b	0,58 a	0,59 b	0,60 b
Fungicida ³	0,51 b	0,57 b	0,65 b	0,45 a	0,57 b	0,60 b
Água	2,13 a	2,21 a	2,41 a	1,86 a	2,03 a	2,11 a
CV (%)	21,23	19,29	23,39	17,14	15,03	18,08

¹ Tratamento realizado por aspersão três dias antes da inoculação;

² Tratamento realizado na 7ª folha; inoculação realizada nas 7ª e 8ª folhas;

³ Azoxystrobin (0,6 g. p. c./ L);

⁴ DAI: dias após a inoculação;

⁵ Médias na coluna, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$.

Foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para comparar os tratamentos (Tabela 4). Através desta variável foi possível resumir as diferentes avaliações obtendo-se um único valor para comparar os tratamentos.

Tabela 4. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro em função do tratamento com extrato aquoso (EA) de *Pycnoporus sanguineus*.

Tratamentos ¹	AACPD	
	7 ^a Folha ²	8 ^a Folha ²
EA 5%	9,99 ab ⁴	9,49 b
EA 10%	11,38 ab	8,03 b
EA 20%	7,6 b	7,05 b
Fungicida ³	6,78 b	5,84 b
Água	24,91 a	22,32 a
C.V. (%)	22,65	19,9

¹ Tratamento realizado por aspersão três dias antes da inoculação;

² Tratamento realizado na 7^a folha; inoculação realizada nas 7^a e 8^a folhas;

³ Azoxystrobin (0,6 g. p. c./ L);

⁴ Médias na coluna, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{(A/100)}$.

Os tratamentos com o EA a 5 e 10% (7^a folha) reduziram em aproximadamente 57% a severidade, mas não diferiram estatisticamente da testemunha (água). O EA a 20% reduziu em 70% a severidade da doença e não diferiu do fungicida. A redução de severidade na 7^a folha tratada com EA de *P. sanguineus* pode ter ocorrido por indução de resistência local e/ou atividade antimicrobiana direta, uma vez que esse EA é capaz de inibir a germinação in vitro de conídios de *C. lindemuthianum*.

Para a 8ª folha, os EAs a 5, 10 e 20% reduziram em média 63% a severidade, sendo esse valor muito próximos ao do fungicida. Esta menor severidade de doença na 8ª folha, quando comparado a testemunha, pode indicar uma indução de resistência sistêmica do extrato aquoso de *P. sanguineus*. Desta forma a utilização de EA de *P. sanguineus*, poderia ser uma opção de controle em cultivos orgânicos, já que apresenta níveis de controle e produtividade similares aos obtidos pelo fungicida. Além disso, o custo de controle com estes produtos seria inferior ao controle com fungicidas do cultivo convencional, fato este que, associado ao melhor preço do feijão cultivado organicamente, renderia ao produtor um lucro relativamente maior.

4.3 Dosagem de peroxidases

A aplicação de EA de *P. sanguineus* em plantas de feijão provocou aumentos local e sistêmico na atividade e atividade específica de peroxidase (Figura 4).

A elevação na atividade local (7ª folha) de peroxidases induzida por *P. sanguineus* foi observada no 3º dia após o tratamento, principalmente para o tratamento com EA a 20%. A atividade específica também teve um incremento, para esse tratamento e esse tempo. Esses incrementos coincidem com o momento da inoculação, o que pode ter contribuído para a redução da severidade causada por *C. lindemuthianum*.

Para a 8ª folha também já havia incremento tanto na atividade quanto na atividade específica no momento da inoculação. Os resultados do somatório da

atividade de peroxidase nos diferentes tempos de amostragem podem ser observados na Tabela 5. Verifica-se que a atividade para os tratamentos com água foram abaixo daquele com EA 20%, mais inoculação.

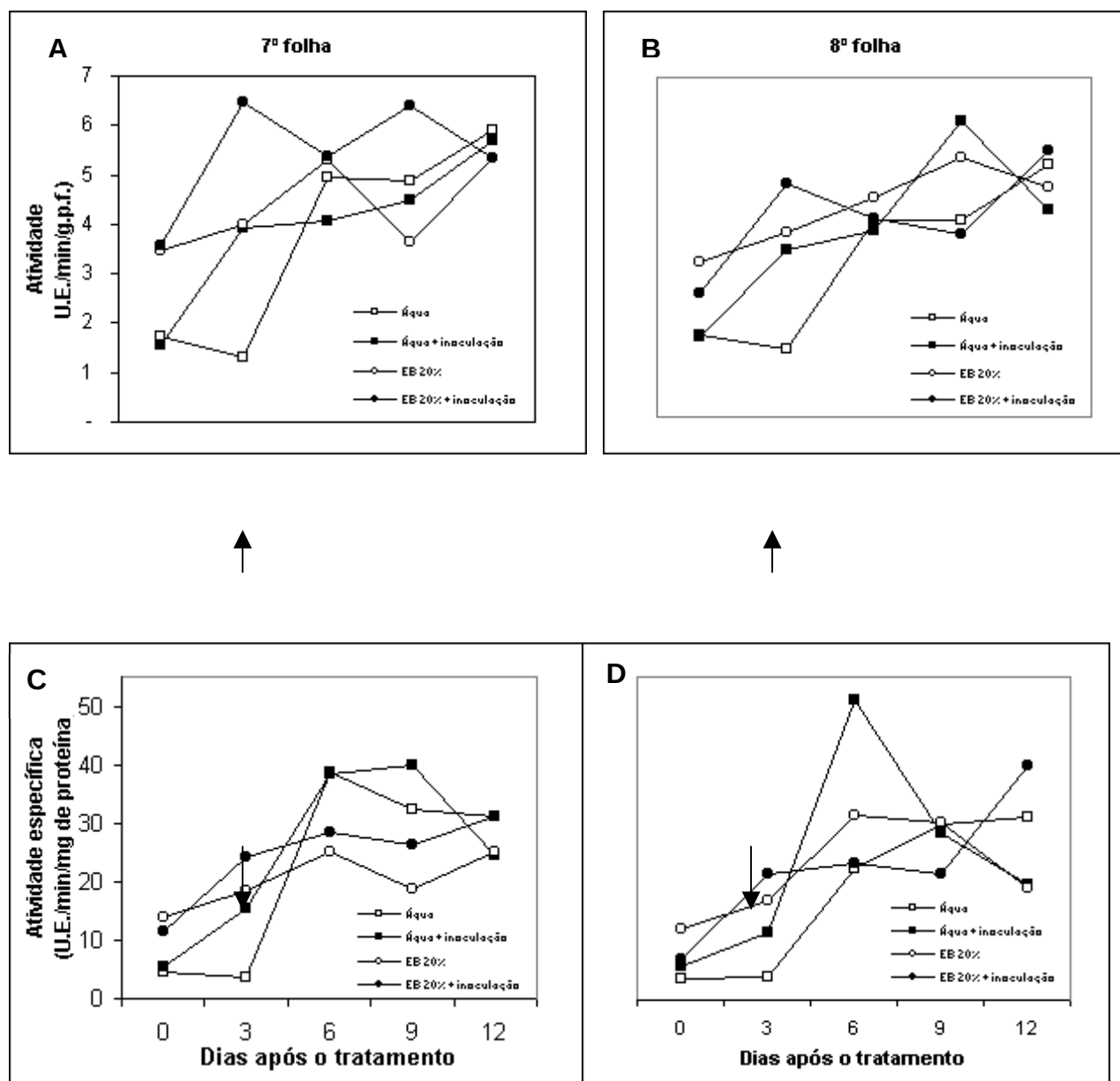


Figura 4. Atividade e atividade específica de peroxidase em feijoeiro tratado com extrato aquoso (EA) de *P. sanguineus* na 7ª folha e inoculado ou não com *C. lindemuthianum* nas 7ª e 8ª folhas. A e C referem-se às atividades na 7ª folha. B e D referem-se às atividades na 8ª folha. A seta indica o momento da inoculação no 3º dia após o tratamento. Água(-□-); água + inoculação (-■-); EA a 20% (-○-); EA a 20% + inoculação (-●-). Atividade expressa em unidade enzimática (U.E.) por minuto de reação por grama de peso fresco (g.p.f.) ou por mg de proteínas.

Para a 8ª folha denota-se também uma diferenciação para com os tratamentos, levando a maior quantificação da atividade de peroxidase para aqueles com EA a 20%, estes últimos não diferindo estatisticamente entre si (inoculados ou não). Esses resultados indicam a ativação de um mecanismo de defesa à distância do local de tratamento, caracterizando indução de resistência sistêmica.

Para a atividade específica, não houve diferença entre os tratamentos com EA e a testemunha água, tanto para a 7ª quanto para a 8ª folha.

Tabela 5. Atividade e atividade específica de peroxidase em feijoeiro tratado com extrato aquoso de *Pycnopus sanguineus* (EA) e inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*.

Tratamentos	Peroxidase ¹			
	Atividade		Atividade específica	
	(U.E./min/g.p.f) ²		(U.E./min/mg proteína) ²	
	7ª Folha	8ª Folha	7ª Folha	8ª Folha
Água ³	18,81 b ⁵	16,43 c	110,31 b	90,65 a
Água ³ + inoculação ⁴	19,72 b	19,35 a	123,95 a	116,30 a
EA 20% ³	21,76 ab	21,63 ab	101,29 b	109,63 a
EA 20% ³ + inoculação ⁴	27,16 a	20,73 b	121,26 b	112,83 a
C.V.(%)	5,09	3,74	6,65	10,7

¹ Esses valores representam o somatório das atividades enzimáticas obtidas em cinco amostragem nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias após os tratamentos;

² Atividade em unidade enzimática (U.E) a 470 nm por minuto de reação por grama de peso fresco (g.p.f) ou mg de proteína;

³ Tratamentos realizados apenas na 7ª folha;

⁴ Inoculação do patógeno (5×10^4 conídios/mL) realizada nas 7ª e 8ª folhas três dias após os tratamentos;

⁵ Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade;

Estudando o mecanismo de ação sobre o controle da antracnose, o EA de *P. sanguineus* desencadeou uma elevação na atividade de peroxidase. Peroxidase

participam do processo de lignificação de células vegetais, o qual pode afetar o desenvolvimento fúngico por bloquear fisicamente o crescimento do patógeno, reduzir a difusão de nutrientes para o fungo ou levar à síntese de precursores de lignina tóxicos ao fungo.

Independente das dificuldades em se indicar o nível de participação de um mecanismo específico na proteção de uma planta, o fato de *P. sanguineus* estar elevando local e sistemicamente a atividade da enzima relacionada à defesa (peroxidase) em feijão, sugere que o controle da antracnose observado é, pelo menos em parte, devido à ação do extrato aquoso do basidiocarpo desse fungo.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podê-se concluir que:

Extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* controlam a antracnose causada por *C. lindemuthianum* em feijoeiro, o que pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta, através da inibição da germinação do conídio, quanto por indução de resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, H.M. do. Teste de sanidade de sementes de arroz. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M. da S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargil, 1987, 358-370 p.

AUGUSTIN, E.; COSTA, J.G.C. da Fontes de resistência a duas raças fisiológicas de *Colletotricum lindemuthianum* no melhoramento do feijoeiro no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.6, p. 265-272, 1971.

BALBI-PEÑA, M.I. **Efeito do extrato do rizoma de *Curcuma longa* e solução de curcumina em *Alternaria solani* e controle de pinta preta em tomateiro**. Marechal Cândido Rondon, 2005. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon.

BENHAMON, N.; LAFITTE, L.; BARTHE, J. P.; ESQUERRÉ-TUGAYE, M.T. Cell surface interactions between ben leaf cells and *Colletotrichum Lindemuthianum*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 97, p. 234-244.1991.

BERGEMEYER, H. U.; GAWEHN, K.; GRASSL, M. Enzymes as biochemical reagents. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2º. ed., New York, Academic Press, 1974, p 494-495.

BIANCHINI, A. MARINGONI, A. C. & CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Hiroshi Kimati, (ed). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 381-391, 1997.

BONATTI, P. M.; LORENZINI, G.; FORNASIEIRO, R. B.; NALI, C.; SGARBI, E. Cythochemical detection of cell wall bound peroxidase in rust infected broad bean leaves. **Journal of Phytophatogy**, Berlin, 140, p. 319-325, 1994.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JR, T. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão Aspectos gerais e Cultura no Estado de Minas**. Viçosa: UFMG, 1998. p. 13-18.

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

COHEN, Y. induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P.E.; SISLER, H.D. (Ed). **Modern Fungicides and Antifungal Compounds**. Andover: Intercept, 1996. p. 461-466.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O . C.; COSTA, J.L.S.; SOUZA, E.D. de TOLEDO; BERNI, R. F. diagnose das doenças. In: CANTERI, M. G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C.S (eds). **Principais Doenças Fúngicas do Feijoeiro**: Orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa: Editora UEPG, 1999. p. 20-22.

DEL PELOSO, M. J.; YOKOYAMA, L. P.; PEREIRA, P. A. A. Situação atual da cultura o feijão no Brasil. In: FANDELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Tecnologia da Produção o Feijão Irrigado**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. p. 135-139.

DEMARCHI, M. **Grãos: feijão. Acompanhamento da situação agropecuária no Paraná**, v. 23, p. 17-24, 1997.

DI PIERO, M. R.; PASCHOLATI, S. F. Efeito das Cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. Sobre *Colletotrichum sublineolum* e na interação do fitopatógeno com plantas de sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 163-169, 2002.

DI PIERO, M. R.; PASCHOLATI, S. F. Indução de Resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 243-250, 2004.

FIORI TUTIDA, Ana Cristina Grade; **Uso de extratos dos Cogumelos *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinem no controle *in vitro* de *Puccinia recôndita* f. sp *tritici* e na indução de resistência em trigo a *bipolaris sorokiniana***. 2003. 112p Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review pf plant Physiology**, Palo alto, n. 37: p 165-186, 1986.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980**. Geneva, Universidade de Geneva, Centro de Botanique, 1982. p. 235-243.

GIANASI, L. Patossistema feijoeiro-antracnose: efeito do Trifenil Acetato de Estanho no crescimento do hospedeiro e no progresso da doença. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v 26, n. 2, p. 309-317, mar./ abr., 2002.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia, University of Missouri Press, 1986. 433p.

HAMMERSCHMIDT, T.R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhance peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p.73-82, 1982.

HIJWEGWN, T.; VERHAAR, M. A.; ZADOKS, J. C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, v. 45, p. 631-635, 1996.

HOAGLAND, R.E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R.E. (ed.). **Microbes and Microbial Products as Herbicides**. Washington, American Chemical Society, 1990. p. 87-113.

ISIGUE, F.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASEKI, H. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. **Plant Physiology**, Lancaster, n.101, p. 193-199, 1993.

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

KUC, J. Systemic induced resistance. In: WALTERS, D. R.; SCHOLLES, J. D.; BRYSON, R. J.; PAUL, N.D.; McROBERTS, N.(Ed.). **Aspects of Applied Biology 42: Physiological Responses of plants to pathogens**. Dundee: Association of Applied Biologists, p. 235-242. 1995.

LUSSO, M,F. G.; PASCHOLATI, S. F. Achivity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathological*. V. 25. 1999. p. 244-249.

LYON, G. D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. **Plant Pathology**, v. 44, p. 407-427, 1995.

MISAGUI, I. J. **Physilogy and Biochemistry of plant-pathogen interaction**. Plenum Press. p.220-225. 1982.

MORAES, W. B. C. Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, 1992, p. 175-190.

PAULA Jr., T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C., PAULA Jr., T. J. de BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: UFV, 1998. p.375-433.

PACUMBABA, R. P.; BEYL, C. A.; PACUMBABA Jr, R. O. Shiitake mycelial leachate suppress growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean *in vitro*. **Plant Disease**, v. 83, p.20-23, 1999.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W. C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 2, p. 1-52. 1994.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo e resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap. 22. p. 417-454.

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Sacharomyces cerevisiae* e outros genes bióticos na proteção de plantas contra patógeno**. Piracicaba, 1998. 123p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J.B. dos; ZIMERMANN, M.J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas : aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: Editora Universidade Federal de Goiânia, 1993. p. 18-19.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Antracnose. In: SARTORATO, A. RAVA, C.A. (Ed.). **Principais Doenças do Feijoeiro Comum e seu Controle**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. p. 17-40.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, V. P. Resistência de cafeeiro a *Meloidogyne exigua*. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 34, São Pedro, 2001. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26 (suplemento), p. 499, ago. 2001. Resumo.

ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. **Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(7): 967-974, October, 2003.

SILVA, C.C. da. Estabelecimento da cultura. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, N. J. O. de (Ed.). **Cultura do Feijoeiro Comum do Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. P. 417-432.

SCHNEIDER, M.; SCHWEIZER, P.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance in plants. **International Review of Cytology**, v. 168, p. 303-340, 1996.

SCHWAN. ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28 (suplemento), p. S54-S56, 2003.

SMANIA , A. F.; MONACHE, F. D.; SMANIA, E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; Cruz, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr) Murr. **Journal of Ethnopharmacology** 45 (1995) 177-181.

SMANIA, E. de F. A.; SMANIA JUNIOR, A. e LOGUERCIO-LEITE, C. **Síntese de cinabarin por tensões de *Pycnoporus sanguineus* e pela atividade antimicrobiana de encontro às bactérias dos produtos de alimento**. Revista de Microbiologia. [online]. Out/dez. 1998, vol. 29, n. 4, p. 317-320. Disponível na Internet via WWW URL:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000137141998000400017&lng=pt&nrm=isso.ISSN 0001-3714. Arquivo capturado em 18 de outubro de 2003.

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

SHUKLA, A. N.; ANIL, R.; RANA, A. Inhibition of *Ganoderma Lucidum* (Leyss) Karst *Polyporus sanguineus* Klotzsch *in vitro*. Indian Journal of Forestry. 1996. 19(1): 26-30.

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMAN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochemie**, v. 75, p. 687-706, 1993.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J.A. de O. **Produção de sementes de feijão**. Viçosa: Epamig, 1993.131p.

VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do Feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1998. p. 231.

VIGO-SCHULTZ, S. C. **Avalização da eficácia da tintura etanolica de guaco (*Mikamia glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor**. Dissertação Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido do Rondon, 2004. 46 p.

YOKOYAMA, L. P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos sócio econômicos da cultura. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMERMANN, M. S. D. O. **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 1-21.

ZULFADHLY, Z.; MASHITAH, M. D.; BHATIA, S.; **Heavy Metals Removal in Fixed-bed column by the macro fungus**. Environmental Pollution 112 (2001) 463 – 470.