

UNIOESTE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

CAMILA PEITER BENINCA

**INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E ATIVIDADE DE PEROXIDASES EM
SORGO E SOJA TRATADOS COM EXTRATOS DE BASIDIOCARPOS
DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
MAIO/2007

CAMILA PEITER BENINCA

**INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E ATIVIDADE DE PEROXIDASES EM
SORGO E SOJA TRATADOS COM EXTRATOS DE BASIDIOCARPOS
DE *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 obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RENATO STANGARLIN

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
MAIO/2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

B467i	<p>Beninca, Camila Peiter</p> <p>Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de <i>Pycnoporus sanguineus</i> / Camila Peiter Beninca. - Marechal Cândido Rondon, 2007. 45 p.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2007.</p> <p>1. Sorgo - Controle de doenças. 2. Soja - Controle de doenças. 3. Sorgo - Indução de resistência. 4. Soja - Indução de resistência. 5. Deoxiantocianidinas. 6. Gliceolina. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.</p> <p>CDD 21.ed. 633.17496 633.3496 CIP-NBR 12899</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539

Ao meu filho Davi, que esteve comigo na
construção desta obra, dentro e fora de
meu ventre

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao esposo Lincoln, a minha mãe Jeanete e ao meu pai Hildemar que contribuíram amorosa e financeiramente para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin, pela ótima orientação e bons conselhos na execução desta dissertação, além de ter aceitado me orientar em meio ao andamento do mestrado.

Obrigada à UNIOESTE, pela oportunidade de estudo no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – nível Mestrado.

As minhas amigas queridas: Nana, Pati, Lu, Gi, Vane e Má, pois com a presença de vocês a vida torna-se mais leve e feliz.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Controle alternativo de doenças.....	12
2.1.1 Mecanismo de defesa das plantas.....	13
2.1.1.1 Produção de fitoalexinas.....	14
2.1.1.2 Atividade de peroxidases.....	16
2.1.2 O uso de basidiocarpos no controle de doenças de plantas.....	17
2.1.3 <i>Pycnopus sanguineus</i>	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Obtenção do fungo <i>Pycnopus sanguineus</i>	23
3.2 Produção do extrato etanólico, hexânico e diclorometânico de <i>Pycnopus sanguineus</i>	23
3.3 Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.....	24
3.4 Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja.....	25
3.5 Atividade de peroxidases.....	25
3.6 Atividade específica de peroxidases.....	26
3.7 Análise dos dados.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.....	27
4.2 Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja.....	29
4.3 Atividade de peroxidases em mesocótilos estiolados de sorgo.....	31
4.4 Atividade de peroxidases em cotilédones de soja.....	32
5 CONCLUSÕES.....	37
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Foto Clair Viécelle.....21
- FIGURA 2 Indução de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento com extrato de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* obtido em hexano. Dados em absorbância por minuto por grama de peso fresco.....28
- FIGURA 3 Atividade específica de peroxidases em cotilédones de soja induzida pelo tratamento com extrato de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* obtido em etanol. Dados em absorbância por minuto por micrograma de proteína.....35

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.....28
- TABELA 2 Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.....29
- TABELA 3 Atividade de peroxidases em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.....32
- TABELA 4 Atividade de peroxidases em cotilédones de soja pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.....33
- TABELA 5 Atividade específica de peroxidases em cotilédones de soja pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano.....36

RESUMO

A indução de resistência em plantas ganhou destaque como alternativa no controle de doenças em decorrência dos problemas do uso indevido de produtos químicos. Através desta técnica, algumas plantas respondem com a produção de compostos secundários, como as fitoalexinas, que são substâncias capazes de impedir a atividade de agentes causadores de doenças. Além destas, há a ativação de peroxidases que contribuem no fortalecimento das paredes celulares, pela formação de lignina em resposta ao ataque de patógenos, bloqueando a entrada do agente causador da doença. A indução de resistência pode ser realizada por diversas substâncias, como os compostos secundários presentes nos fungos, tendo como exemplo o Basidiomycota *Pycnopus sanguineus*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a indução de fitoalexinas e a atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus*. Com essa finalidade, os extratos diclorometânico, hexânico e etanólico nas concentrações de 100, 250, 500 e 750 mg L⁻¹ foram testados em relação à produção de fitoalexinas e atividade de peroxidases em cotilédones de soja e mesocótilos estiolados de sorgo. Acibenzolar-S-metil (ASM) (100 mg L⁻¹ i.a.) e água destilada + Tween 20 (0,5%) foram utilizados como tratamentos controle positivo e negativo, respectivamente. Para o ensaio de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, o extrato hexânico na concentração de 750 mg L⁻¹ proporcionou a maior indução, sendo estatisticamente superior à testemunha negativa, porém sem diferir significativamente do ASM. Para fitoalexinas em cotilédones de soja, os extratos de *P. sanguineus* não induziram atividade significativamente diferente dos tratamentos controles positivo e negativo, havendo inclusive uma tendência de supressão da síntese de gliceolina pelo extrato diclorometânico. Em relação à atividade de peroxidases, os extratos diclorometânico para sorgo e soja e etanólico para soja inibiram a atividade enzimática. A atividade específica de peroxidase em soja foi inibida pelo extrato etanólico e induzida pelo hexânico, mas sem diferença do tratamento com ASM. Esses resultados indicam o pequeno potencial destes extratos para a indução de resistência em sorgo e soja. Palavras-chave: Indução de resistência, gliceolina, deoxiantocianidinas.

ABSTRACT

The induced resistance is an alternative for control of plant diseases, because the incorrect use of chemical products have been caused several problems to the environment. With the induced resistance, plants can produce secondary compounds, as the phytoalexins with antimicrobial activity. Additionally, peroxidases can be activated, causing cell walls reinforcement, through the formation of lignin that blocking the attack of pathogens. The resistance induced can be carried through by several substances, as secondary compounds produced by fungus, as the Basidiomycota *Pycnoporus sanguineus*. This work aimed to verify the phytoalexins induced and the peroxidases activity in sorghum and soybean treated with *P. sanguineus* basidiocarp extracts. With this purpose, the dichloromethanic, hexanic and ethanolic extracts, in concentrations of 100, 250, 500 and 750 mg L⁻¹ were used for phytoalexins production and peroxidases activity in soybean cotyledons and sorghum etiolated mesocotyls. The acybenzolar-S-metil (ASM) (100 mg L⁻¹ of active ingredient) and distilled water + Tween 20 (0.5%) were used as positive and negative patterns, respectively. For the phytoalexins assay in sorghum mesocotyls, the hexanic extract in concentration of 750 mg L⁻¹ provided the highest induction in comparison to the control with water, however without differences to ASM. For the phytoalexins assay in the soybean cotyledons, the *P. sanguineus* extracts not induced activity significantly different of the positive and negative patterns, but also causing a suppression of the glyceollin synthesis for the dichloromethanic extract. In relation to the peroxidases activity, the dichloromethanic extracts for sorghum and soybean and ethanolic for soybean had inhibited the enzymatic activity. The induction verified for the hexanic extract in sorghum was not different from ASM control. The specific activity of peroxidase in soybean was inhibited by the ethanolic extract and it was induced by the hexanic, but with no differences of the treatment with ASM. These results indicate the weak potential of these extracts for the resistance induction in sorghum and soybean.

Key words: Induced resistance, glyceollin, deoxyanthocianidins.

INTRODUÇÃO

Apesar dos esforços na obtenção de cultivares resistentes ao ataque de patógenos, muitos produtores ainda são obrigados a usar a proteção química que mesmo com os benefícios alcançados pelo seu uso racional em curto prazo, em longo prazo geram poluição ambiental, contaminação do aplicador e seleção de isolados do patógeno resistentes aos produtos químicos usados. Por esse motivo, é importante a substituição do uso de agrotóxicos por meios alternativos eficientes de controle de doenças, sendo este um dos grandes desafios da agricultura sustentável.

A estratégia correta seria encontrar uma forma, a mais inócua possível, de ativar os mecanismos de defesa da planta deixando que ela própria se proteja contra patógenos, ao invés de saturá-la e intoxicá-la com o uso de defensivos. Essa tentativa das plantas em se proteger já ocorre constantemente, exigindo uma ação geral de todos os mecanismos disponíveis que, juntos, tentam combater o maior número de patógenos em potencial, geralmente alcançando o sucesso. Através da indução de resistência as plantas têm seus mecanismos de defesa ativados, após exposição a um agente indutor que sinaliza a produção de compostos bioativos responsáveis pela proteção, não apenas no sítio de indução como também em outros locais. Algumas plantas respondem à essa exposição com a produção de fitoalexinas, que são substâncias amplamente estudadas por impedir a atividade de agentes causadores de doenças. Além das fitoalexinas, existe a ativação de enzimas como as peroxidases que, mesmo não sendo utilizadas como marcadoras de resistência, contribuem no fortalecimento das paredes celulares, catalisando a formação de lignina em resposta ao ataque de patógenos, bloqueando a entrada do agente causador da doença.

A indução de resistência pode ser realizada por diversas substâncias eliciadoras ou elicitoras de defesa vegetal, entre elas compostos secundários presentes nos fungos, tendo como exemplo os Basidiomicetos (com corpos de

frutificação do tipo “orelha-de-pau” e cogumelo), conhecidos pela presença de substâncias que inibem o crescimento de um amplo espectro de fungos fitopatogênicos, saprofiticos e bactérias de seu microhabitat. Apesar do grande potencial e diversidade desses fungos em ecossistemas tropicais, as pesquisas conduzidas no Brasil para a descoberta de novos compostos bioativos são poucas, sendo a maioria direcionada aos cogumelos comestíveis ou medicinais.

O fungo *Pycnoporus sanguineus* é um Basidiomiceto encontrado em áreas tropicais e sub-tropicais, alimentando-se saprofiticamente de algumas espécies de madeira. Tornou-se conhecido por suas características fitoterápicas, antibacteriana, antifúngica e atividade adstringente. Possui rápida propagação no meio ambiente, devido a grande produção de esporos e é comumente encontrado na região Oeste do Paraná. Trabalhos com o uso de *P. sanguineus* no controle de doenças de plantas ainda são poucos, porém os resultados apresentados até o momento são promissores.

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivos estudar a indução de fitoalexinas e a atividade de peroxidases em mesocótilos estiolados de sorgo e em cotilédones de soja tratados com diferentes concentrações de extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle alternativo de doenças

No controle alternativo de doenças incluem-se o controle biológico e a indução de resistência em plantas. O controle biológico visa manter um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema. A indução de resistência (chamada também de indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida) promove a ativação de um sistema de defesa latente na planta, que se manifesta quando a mesma entra em contato com agentes bióticos (enzimas microbianas, microrganismos viáveis ou inativados e material de parede de fungos e células vegetais) ou abióticos (ácido aminobutírico, ácido 2,6-dicloroisonicotínico, acibenzolar-S-metil, metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros) (BONALDO et al., 2005). Moléculas ou agentes de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de defesa nas plantas são chamadas de elicitores ou eliciadores, podendo atuar, neste caso, como indutores de resistência (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994; PASCHOLATI & LEITE, 1995; COHEN, 1996; HIJWEGWN et al., 1996; SMITH, 1996; PASCHOLATI, 1998; BHAGWATH & HJORTSO, 2000; STANGARLIN et al., 1999).

Indutores de resistência à base de um análogo funcional do ácido salicílico, como o acibenzolar-S-metil (ASM) conhecido como Bion[®], têm sido usado nos últimos anos como indutores químicos de resistência, contra fungos, vírus e bactérias. O ASM promove nas células das plantas a indução para produção de proteínas relacionadas com a patogênese, tais como β ,1-3 glucanase e quitinase, que são capazes de degradar a parede celular de fungos e bactérias patogênicos (KOBAYASTI et al., 2001; MCKENZIE, 2001; SILVA et al., 2001; OSSWALD et al., 2004).

Indutores de resistência não químicos têm sido utilizados nos últimos anos, como os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais com propriedades antimicrobianas e/ou indutoras de resistência (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005), bem como os extratos obtidos de cogumelos (FIORI-TUTIDA, 2003; DI PIERO & PASCHOLATI, 2004; ASSI, 2005; DI PIERO et al., 2006).

2.1.1 Mecanismo de defesa das plantas

Assume-se, em Fitopatologia, que resistência é regra e suscetibilidade é exceção. Se não fosse assim, qualquer patógeno seria capaz de infectar qualquer planta e, a curto prazo em termos evolutivos, os vegetais desapareceriam da face da terra. Esse fato não acontece porque os mecanismos de defesa das plantas contra os fitopatógenos existem em multiplicidade e são extremamente eficientes (ROMEIRO, 1999).

Esses mecanismos são divididos em pré-formados, presentes na planta antes do contato com o patógeno, e pós-formados, produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Segundo Pascholati & Leite (1995) e Resende & Machado (2000), cada mecanismo compreende:

Pré-formados (passivos, constitutivos):

- estruturais: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;
- bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas, glicosídeos, glicosídeos fenólicos e cianogênicos e inibidores protéicos.

Pós-formados (ativos, induzíveis):

- estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses;
- bioquímicos: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (como peroxidase, β -1,3 glucanase e quitinase).

Através de mecanismos induzidos de defesa ou após o reconhecimento de um patógeno, ocorre a produção de um sinal, liberado a partir da folha infectada, sendo traslocado intracelularmente para outras partes da planta. Esse sinal desencadeia mudanças em fluxos iônicos ao longo da membrana plasmática, eventos de fosforilação de várias proteínas, geração de espécies reativas de oxigênio (como peróxido de hidrogênio e radical superóxido) e por fim induz reações

de defesa, resultando na resistência sistêmica adquirida. Essa resistência é relatada em diversas espécies, apresentando uma defesa contra vários microrganismos, necessitando de um tempo após o tratamento indutor para que o mesmo se estabeleça e para que seja mantido por um longo período (MÉTRAUX, 2001). Segundo Somssich e Hahlbrock (1998), não há relatos de algum caso estabelecido de um composto ou uma via que esteja exclusivamente envolvida na defesa de um patógeno, o que ocorre é uma ação geral de todos os mecanismos disponíveis que, juntos, tentam combater o maior número de patógenos em potencial.

Uma barreira química importante realizada pela planta é a reação de hipersensibilidade, que consiste em um dos mais eficientes mecanismos de defesa a patógenos. Essa reação pode ser vista como uma espécie de “suicídio” de algumas poucas células da planta em prol da sobrevivência das demais e é considerada como uma forma de defesa induzida, culminando na parada do crescimento e do desenvolvimento do patógeno nos tecidos da planta. A resposta ocorre em função do reconhecimento da infecção, por parte do hospedeiro, como uma consequência da incompatibilidade entre planta e patógeno, portanto a reação de hipersensibilidade só ocorre quando a planta é infectada por vírus, fungos ou bactérias (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Além dessa forma de defesa, ocorre a indução da produção de substâncias como as fitoalexinas e várias proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR, como as PR-9, constituída de peroxidases), resultando na morte repentina de um número limitado de células em torno dos sítios de infecção do hospedeiro (STINTIZI et al., 1993; PASCHOLATI & LEITE, 1995).

2.1.1.1 Produção de fitoalexinas

As fitoalexinas (do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele) são definidas como compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, sintetizadas e acumuladas temporariamente nas plantas após estresses físicos, químicos ou biológicos, como o contato com microrganismos. Seu papel na resistência a patógenos é amplamente estudado, sendo capazes de reduzir ou impedir a atividade de agentes patogênicos. Sua produção após a infecção sugere que um produto do patógeno ou da interação patógeno-hospedeiro esteja envolvido no

desencadeamento da biossíntese de fitoalexinas, como carboidratos, proteínas ou lipídios (KUC, 1995; HAHN, 1996; SMITH, 1996; WULFF & PASCHOLATI, 1998 e 1999).

Mais de 300 fitoalexinas já foram caracterizadas entre diferentes classes de compostos químicos e naturais como cumarina, diterpeno, flavonóide, alcalóides, compostos fenólicos entre outros, e foram identificadas em mais de 20 famílias de vegetais. São produtos naturais, ausentes na planta sadia, sintetizadas em inclusões citoplasmáticas próximas ao local da tentativa de penetração do patógeno e acumuladas temporariamente no local e nos arredores da infecção (LOPEZ, 1993). Sua ação nos fungos se dá por desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas. Esses efeitos refletem-se na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução do crescimento micelial. Ao contrário dos anticorpos produzidos pelos animais, as fitoalexinas não são proteínas, não apresentam especificidade e não imunizam a planta (SNYDER & NICHOLSON, 1990; LO et al., 1996; LABANCA, 2002).

Substâncias de diversas origens podem atuar como eliciadores na indução de fitoalexinas. Os eliciadores de origem microbiana podem ser compostos por fragmentos das paredes celulares de fungos (glucanas, quitosanas, glicoproteínas e polissacarídeos), células bacterianas, partículas virais e homogenados livres de células vegetais. As substâncias bióticas de origem química podem ser os carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas ou lipídios. No caso dos eliciadores endógenos, existem os fragmentos da parede celular das plantas (oligogalacturonídeos), os quais são liberados pela ação de enzimas degradadoras da parede, produzidas por fungos e bactérias ou pelas próprias células danificadas da planta. Além disso, as fitoalexinas podem se acumular nos tecidos em resposta a eliciadores abióticos, que causam estresse na planta, como luz ultravioleta, metal pesado (HgCl_2) ou mesmo em consequência de ferimentos (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

Em sorgo são produzidos compostos fenólicos em resposta a inoculação com fungos patogênicos ou não, sendo que entre estes, foram identificadas quatro fitoalexinas derivadas de antocianidinas (flavonóides-3-deoxiantocianidinas): luteolinidina, apigeninidina, éster do ácido caféico de arabinosil 5-*o*-apigeninidina e 5-metoxiluteolinidina. Estas fitoalexinas, produzidas quando tecidos de sorgo são inoculados com um patógeno, são coloridas e se apresentam bem para este tipo de

estudo. Essas substâncias são sintetizadas em mesocótilos e folíolos, sendo que nos folíolos o acúmulo é restrito a uma pequena área da epiderme, enquanto que nos mesocótilos formam-se grandes lesões ao longo do sítio de infecção, com inclusões de coloração laranja-marrom a avermelhadas (NICHOLSON et al., 1987; HIPSKIND et al., 1996; LO et al., 1996). No caso da soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos (BURDEN & BAILEY, 1975; SMITH, 1996). Bioensaios com mesocótilos estiolados de sorgo e com cotilédones de soja são ferramentas importantes para se testar o efeito elicitador de um tratamento (STANGARLIN et al., 1999).

Wulff & Pascholati (1998, 1999) em estudos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na atividade elicitadora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, obtiveram resultados positivos, demonstrando que os mesocótilos tratados apresentaram pigmentação característica da síntese de fitoalexinas.

Simões et al. (2005) estudou a purificação e caracterização de um eliciador de fitoalexinas de esporos do fungo saprófita *Mucor ramosissimus*. A purificação resultou em considerável aumento (seis vezes) de atividade específica do eliciador. Os resultados sugerem que fragmentos de um polissacarídeo do tipo mucorano são os eliciadores de fitoalexinas presentes nos esporos de *M. ramosissimus*. Os resultados também indicam, pela primeira vez, que os tecidos de cotilédones de soja reconhecem fragmentos de heteropolímeros de ácidos urônicos como eliciadores de fitoalexinas.

2.1.1.2 Atividade de peroxidases

A família de proteínas PR-9, constituída por peroxidases, contribui no fortalecimento das paredes celulares das plantas, através da incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, formando e depositando o polímero lignina (TENHAKEN et al., 1995). As peroxidases também oxidam compostos fenólicos, participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno em resposta ao ataque de patógenos, regulam o nível de ácido indolacético e a dormência das sementes (LAGRIMINI et al., 1987; ABELES & BILES, 1991; ASADA, 1992; GUZZO, 2003).

As peroxidases são classificadas como glicoproteínas que catalisam uma série de reações, cujo interesse maior envolve o papel que elas desempenham no bloqueio de um patógeno. Estas juntamente com outras enzimas, como a superóxido dismutase e a catalase, atuam sobre as espécies reativas de oxigênio não só quando as plantas são danificadas por um patógeno, mas também quando as plantas são expostas a outros tipos de estresses (JAGPAT & BHARGAVA, 1995; PEIXOTO et al., 1999).

A alteração da atividade de peroxidases é um indício de metabolismo alterado, apesar disso as peroxidases não podem ser utilizadas como marcadores de resistência, pois se verificou que essas enzimas não têm uma relação direta com o estabelecimento da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA). Pelo fato de uma das funções das peroxidases ser a formação da lignina pela polimerização de fenóis, é esperado que alterações na atividade das peroxidases envolvam outras enzimas presentes na mesma rota metabólica (LABANCA, 2002).

2.1.2 Uso de Basidiocarpos no controle de doenças de plantas

Os Basidiocarpos constituem uma divisão do reino Fungi que engloba os fungos mais evoluídos, apresentando micélio com hifas septadas. Uma das características do grupo é a presença de estruturas especiais de reprodução – os basídios – que formam os basidiósporos. Os basídios podem ser formados diretamente sobre o micélio ou na parte inferior do “chapéu” ou píleo do corpo de frutificação, denominado basidiocarpo. Este, na maioria das espécies, forma o cogumelo quando o basidiocarpo apresenta haste ou estipe. Quando o basidiocarpo não apresenta haste e o píleo é de consistência lenhosa, têm-se as “orelhas-de-pau” (KRUGNER & BACHI, 1995).

As primeiras pesquisas sobre o potencial dos fungos da divisão Basidiomycota como antibióticos foram realizadas por Anchel, Hervey e Wilkins em 1941 (SANDVEN, 2000), quando examinavam extratos do corpo de frutificação e cultura micelial em mais de duas mil espécies de fungos. Eles detectaram e isolaram o composto pleuromutilin, um diterpeno especialmente usado no tratamento de infecções micoplasmáticas em animais (BRIZUELA et al., 1998), servindo para o desenvolvimento do primeiro antibiótico comercial originado de Basidiomicetos.

Todavia, mais de 6 mil metabólitos já foram identificados desses fungos imperfeitos, como compostos fenólicos, ácidos fenilglicoxídicos, purinas, quinonas e derivados terpênicos, tornado difícil o isolamento de novos compostos bioativos. Com o desenvolvimento de novas tecnologias de fermentação e purificação, os Basidiomycotas estão recebendo atenção como fonte para novas classes de antibióticos (BENEDICT & BRADY, 1972; ANKE, 1989; MAZIERO et al., 1999; SUAY et al., 2000; ROSA et al., 2003).

A atividade antimicrobiana do Basidiomycota *Polystictus sanguineus* é conhecida desde 1946, quando Bose (1946) isolou poliporin, um composto ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e sem toxicidade aos animais.

Lemberg et al. (1952), também estudando a ação antibiótica de *Polystictus sanguineus* (família Polyporaceae), utilizaram solventes com polaridades negativas (álcool butílico, diclorometano, éter etílico, éter de petróleo, heptano e hexano) que não apresentaram ação antibiótica contra bactérias gram-negativas e os solventes com polaridades positivas (acetato etílico, acetona e metanol) que mostraram atividade antimicrobiana com baixas concentrações.

Estudos realizados por Anke (1989, 1995) relatam a diversidade de componentes isolados de Basidiomicetos que promovem a inibição do crescimento de microrganismos que compõem seu microhabitat, ressaltando a importância das substâncias antimicrobianas produzidas por esses fungos.

Brizuela et al. (1998) relatam em suas conclusões que, em geral, os Basidiomicetos possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de moléculas aromáticas, tanto em meio natural como sintético. Uma das vantagens mais significativas dos Basidiomicetos é o amplo espectro de atividades enzimáticas, destacando-se em diversos sistemas biológicos, principalmente pela sua capacidade de produção de inibidores de enzimas. Sabe-se que a ação de muitos agentes farmacológicos é dada por sua capacidade de inibir determinadas enzimas e que numerosas doenças estão associadas a uma excessiva e/ou não regulada atividade enzimática, sendo que as substâncias inibidoras de enzimas podem apontar atividades farmacológicas benéficas. O autor ressalta que, mesmo que as bactérias e leveduras ofereçam vantagens tecnológicas de cultivo e conhecimento biológico vasto, os Basidiomicetos apresentam potencialidades de biossíntese mais interessantes e numerosas, sendo condizente aprofundar o estudo do cultivo e

manejo destes microrganismos com a finalidade de identificar metabólitos novos e úteis ao homem.

Entre os Basidiomicetos, a família Polyporaceae tem sido a mais estudada, sendo que aproximadamente 75% de suas espécies apresentam grande atividade antimicrobiana. Numerosos componentes desses fungos, como polissacarídeos derivados da parede celular, apresentam atividade antiviral, citotóxica e/ou anti-neoplásica. Estes componentes têm atraído atenção nos últimos anos por sua atividade imunomodulatória que resulta em um efeito na prevenção de tumores (WASSER, 2002). Essas substâncias de alto peso molecular, chamados de Modificadores de Resposta Biológica (BRM) ou imunopotenciadores, agem contra a carcinogênese, mostrando efeitos diretos no combate ao câncer, prevenindo metástases. No mercado Japonês, alguns desses polissacarídeos ligados a proteínas isolados de Basidiomicetos, têm encontrado espaço por apresentarem ação fitotóxica, imunomodulatória, analgésica, antidiabética, inseticida, nematicida e cardiovascular. As pesquisas mais avançadas no isolamento de componentes da família Polyporaceae, bem como de outros Basidiomicetos, são realizadas na Alemanha, Japão, Korea e na China, onde o uso de cogumelos medicinais tornou-se tradição (ZJAWIONY, 2004).

Ainda que a diversidade dos Basidiomicetos em ecossistemas tropicais seja vasta (HAWKSWORTH, 1991), no Brasil existem poucas pesquisas para a descoberta de novos compostos bioativos empregados no controle de doenças de plantas. As espécies de cogumelos mais facilmente reconhecidas como os comestíveis (ISHIKAWA et al., 2001; PACCOLA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002) ou medicinais, são alvo da maioria das investigações (SMÂNIA et al., 1995a, SMÂNIA et al., 1995b, 1997, 1999).

Pacumbaba et al. (1999) observaram que o fluido de micélios do basidiomiceto *Lentinula edodes* (Shiitake) possui atividade inibitória 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*.

Piccinin (2000), trabalhando com filtrados de basidiocarpo, píleo, estipe, filtrado autoclavado de basidiocarpo, filtrado de basidiocarpo, filtrado de

basidiocarpo autoclavado, filtrado de crescimento micelial e filtrado do micélio macerado do cogumelo *L. edodes*, também observou o eliciamento da produção de fitoalexinas do complexo das deoxiantocianidinas em sorgo e gliceolinas em soja.

Fiori-Tutida (2003) realizou experimentos utilizando extratos aquosos dos cogumelos *L. edodes* e *Agaricus blazei* (Cogumelo do Sol), verificando que os mesmos estimularam a produção de fitoalexinas em sorgo e soja, induziram a produção de proteínas-PR (β 1,3-glucanase e peroxidase) em trigo e ativaram rotas metabólicas para a formação de papilas em mesocótilos de trigo, indicando assim, que esses cogumelos apresentam potencial como eliciadores de resposta de defesa em plântulas.

Di Piero (2003) constatou em seus experimentos com extratos aquosos de Basidiocarpos de *L. edodes* e *A. blazei* que houve indução de resistência em plantas de pepino pelos dois cogumelos testados. Em plantas de tomate, apenas *A. blazei* apresentou potencial para o controle da bacteriose *Xanthomonas vesicatoria*.

2.1.3 *Pycnoporus sanguineus*

Evidências genéticas e morfológicas indicam a presença de três espécies para o gênero *Pycnoporus*: *P. cinnabarinus* (Jacq. Ex Fr.) Karst., que ocorre em regiões de clima temperado no hemisfério Norte; *P. coccineus* (Fr.) Bond & Sing., que ocorre em regiões de clima temperado do hemisfério Sul e em países vizinhos à Índia e oceano pacífico; e *P. sanguineus* (L. Ex Fr.) Murr. que ocorre em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios Norte e Sul (NOBLES & FREW, 1962).

O fungo *P. sanguineus* é conhecido popularmente como orelha-de-pau, pertence à Divisão Basidiomycota, classe Hymenomycetes, ordem Aphyllophorales e família Polyporaceae. Pelo seu hábito saprofítico, nutre-se de algumas espécies de madeiras nas florestas. Tornou-se conhecido pelas características fitoterápicas empregadas em tratamentos de reumatismo, artrite e gota. Quando moído e em infusão é usado contra disenteria, cistos subcutâneos, verrugas e para desinflamar os pés. Possui ainda atividade adstringente, antibacteriana e antifúngica. Fidalgo (1965) relata que alguns indígenas brasileiros usavam *P. sanguineus* para estancar hemorragias. Segundo Pérez-Silva et al. (1988), o fungo tem sido usado na medicina popular por tribos indígenas das Américas e da África para tratamento de diversas

injúrias. Esta espécie apresenta uma frutificação semi-circular e encontra-se distribuída horizontalmente contra os caules das árvores. Sua superfície é lisa e ligeiramente marcada em zonas concêntricas de coloração vermelho-laranja (LEPP, 2005) (Figura 1).



Figura 1. Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Foto Clair Viecelli.

Além das características citadas, Zulfadhly et al. (2001) indicam o uso de *P. sanguineus* para a remoção de metais pesados, como Pb^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} fixados na coluna do leito de rios. Siqueira et al. (1997) relatam a presença de três importantes enzimas hidrolíticas, α -amilase, β -glicosidase e xilanase em micélios de *P. sanguineus*.

Smânia et al. (1998) realizaram estudos com *P. sanguineus* observando a síntese de metabólitos secundários e a atividade antimicrobiana contra bactérias de

produtos alimentícios. Observaram que o fungo produziu cinnabarina, um antibiótico de coloração laranja que inibiu o crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconostoc plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. Os microrganismos *B. cereus* e *L. plantarum* foram inibidos com a menor concentração testada (0,0625 mg mL). A espécie *K. pneumoniae* foi a que apresentou menor inibição (>4,0 mg mL) pelo antibiótico de *P. sanguineus*.

Smânia Jr. et al. (2003) realizaram experimentos com toxicidade e atividade antiviral de cinnabarina obtida com extratos etanólico e cetônico de *P. sanguineus* e observaram que essa substância, mesmo em baixas concentrações (0,62 mg mL), causou alterações na viabilidade e morfologia das células de camundongos, porém, sem causar injúria sistêmica ou morte em baixas ou em altas concentrações.

Rosa et al. (2003) em um “screening” com Basidiomicetos para testar a atividade antimicrobiana, realizaram testes com 84 espécies desta ordem de fungos de diferentes ecossistemas brasileiros contra microrganismos patogênicos e não-patogênicos. Concluíram que o isolado CCB277 de *P. sanguineus* inibiu o crescimento da levedura *Candida krusei* e das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Halaouli et al. (2005) identificaram em seus estudos o isolado CBS 614.73 de *P. sanguineus* como tendo potencial para a produção de tirosina, uma substância que demonstrou ser eficiente na síntese de moléculas antioxidantes e no “cross-linking” de proteínas.

Assi (2005) utilizou extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para o controle de *Colletotrichum lindemuthianum* em ensaios *in vitro* e no cultivo do feijoeiro, concluindo que houve controle do patógeno, tanto por atividade antimicrobiana direta, através da inibição da germinação de conídios, quanto por indução de resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A primeira fase do projeto foi realizada no laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da UNIOESTE – Campus de Cascavel, PR, onde os basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* foram submetidos às extrações hexânica, etanólica e diclorometânica.

A segunda fase do projeto foi realizada no laboratório de Fitopatologia da UNIOESTE – Campus Marechal Cândido Rondon, PR. Os extratos hexânico, etanólico e diclorometânico de *P. sanguineus* foram submetidos aos testes da indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases.

1ª fase – Obtenção dos extratos

3.1 Obtenção do fungo *P. sanguineus*

Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados nas matas da região Oeste do Paraná. Posteriormente foram secos em temperatura constante de 30 °C, triturados em moinho de esfera e o pó armazenado em geladeira à 4 °C.

3.2 Produção do extrato etanólico, hexânico e diclorometânico de *P. sanguineus*

Uma porção de aproximadamente 160 g do fungo, na forma de pó seco de basidiocarpo, foi submetida à extração com três solventes orgânicos de diferentes polaridades, hexano, etanol e diclorometano. O material foi preparado em cartucho de papel filtro e colocado em aparelho Soxhlet com capacidade para 2 L em um

procedimento cíclico durante 100 h para cada solvente, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo assim três compostos orgânicos que foram utilizados nos experimentos. As soluções finais foram preparadas em quatro diferentes concentrações: 100, 250, 500 e 750 mg L^{-1} em água contendo 0,5% de Tween 20.

2ª fase – Testes *in vitro*

3.3 Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cv. Brandes foram desinfestadas superficialmente com etanol 50% por 2 min, hipoclororito de sódio 1% por 15 min e lavadas em água destilada. Posteriormente, foram enroladas entre folhas de papel de germinação umedecidas e incubadas no escuro por um período de 72-90 h à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após este período no escuro, as plântulas foram mantidas por 4 h na luz visando paralisar a alongação dos mesocótilos. Este processo resultou em plântulas com mesocótilos uniformemente alongados e adequados para o ensaio de produção de fitoalexinas (NICHOLSON et al., 1988; YAMAOKA et al., 1990).

Os mesocótilos obtidos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos de ensaio para microcentrífuga (eppendorfs: 1,2 cm de diâmetro x 3 cm de altura) (quatro mesocótilos/tubo) contendo uma alíquota de 1 mL de cada concentração dos extratos hexânico, etanólico e diclorometânico de *P. sanguineus*. Como testemunhas foram utilizadas água destilada esterilizada com 0,5% de Tween 20 e o ativador de defesa vegetal acibenzolar-S-metil (ASM) (100 mg i.a.) (OSSWALD et al., 2004). Os tubos de ensaio, abertos, foram colocados numa cuba de vidro e mantidos em câmara úmida, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob luz fluorescente (WULFF & PASCHOLATI, 1999). Após 60 h, os mesocótilos foram retirados dos tubos, secos e os 5 mm basais de cada mesocótilo foram excisados e descartados. A porção superior (2,5 cm) (excetuando-se as folhas) foi pesada, cortada em pequenos segmentos e colocada em novos eppendorfs contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v). Os mesocótilos cortados foram mantidos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ no metanol por 96 h para extração dos pigmentos e a absorbância determinada em

espectrofotômetro a 480 nm (NICHOLSON et al., 1987, 1988). O material vegetal residual desta etapa (mesocótilos) foi enrolado em papel alumínio e congelado em freezer para o teste de peroxidases.

3.4 Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Sementes da soja (*Glycine max* L.) cultivar CD 202 (VIGO et al., 2001) foram desinfestadas em hipoclorito de sódio por dez min para posteriormente serem colocadas em areia esterilizada (autoclavada) e mantidas em casa de vegetação visando a germinação das sementes. Após dez dias da semeadura, os cotilédones foram destacados das plântulas, lavados em água destilada, enxugados e cortados em secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro a partir da superfície inferior. Quatro cotilédones foram colocados em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Foi aplicada sobre cada cotilédone uma alíquota de 40 µL de cada concentração (100, 250, 500 e 750 mg L⁻¹) das três soluções do extrato de *P. sanguineus* além dos controles Tween 20 (0,5%) e ASM (100 mg i.a.). As placas de Petri foram mantidas a 25 °C e escuro. Após 20 h, os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada esterilizada e deixados em agitação por 1 h para extração da fitoalexina formada. A absorbância foi determinada a 285 nm (AYERS et al., 1976; ZIEGLER & PONTZEN, 1982). Após esta etapa os cotilédones foram enrolados em papel alumínio e congelados em freezer para o teste de peroxidases.

3.5 Atividade de peroxidases

As amostras congeladas remanescentes dos testes de produção de fitoalexinas em sorgo e soja foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato (tampão de extração) 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 6.000 g durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as peroxidases solúveis, foi armazenado a 4 °C. A atividade das peroxidases foi determinada a 30 °C, através da leitura em espectrofotômetro. A mistura da solução consistiu de 2,9 mL de uma solução contendo 250 µL de guaiacol

e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 0,1 mL de preparação enzimática (sobrenadante do material vegetal). O total da cubeta de referência consistiu em 3,0 mL de solução. A reação enzimática foi lida em espectrofotômetro a 470 nm e os resultados estão expressos em variação de unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de peso fresco (FIORI-TUTIDA, 2003).

3.6 Atividade específica de peroxidases

Para a determinação do conteúdo total de proteínas foi utilizado o método de Bradford (1976). Para tanto, foram adicionados 0,2 mL do reagente de Bradford concentrado em cada 0,8 mL de amostra. Após 5 min, realizou-se a leitura de absorvância no espectrofotômetro a 595 nm. Os dados foram expressos em μg de proteína mL^{-1} .

3.7 Análise dos dados

Para a avaliação do experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições e 14 tratamentos, com esquema fatorial $3 \times 4 + 2$, cujos tratamentos foram: três soluções orgânicas de *P. sanguineus* (hexânica, etanólica e diclorometânica) com quatro concentrações cada (100, 250, 500 e 750 mg L^{-1}), além dos dois controles (água destilada + Tween 20) (controle negativo) e ASM (controle positivo). As médias do fator qualitativo (soluções orgânicas) foram comparadas pelo método de Dunnett a 5% de probabilidade. Os dados quantitativos (concentrações) foram submetidos à análise de variância, obtendo-se equações de regressão (Programa Estatístico Sisvar) e as médias comparadas pelo teste de Tukey quando pertinentes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo

A análise de variância demonstrou significância do teste F, em nível de 5% de probabilidade, para a capacidade de induzir a produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo para os três extratos orgânicos testados (análise qualitativa). Entretanto, ao realizar o teste de Dunnett ($P \leq 0,05$), pôde-se verificar que somente o extrato hexânico a 750 mg L^{-1} e o extrato etanólico a 100 mg L^{-1} de *P. sanguineus* tiveram atividade eliciadora efetiva, ou seja, proporcionaram valores de absorvância que não diferiram estatisticamente da testemunha ASM (controle positivo) (Tabela 1), embora esses valores tenham sido 39% e 78% menores, respectivamente, que o obtido pelo ASM. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre suas médias, porém diferiram da testemunha ASM, sendo verificados valores inferiores a esta. O tratamento com hexano a 750 mg L^{-1} foi estatisticamente superior à testemunha negativa água + Tween 20 (0,5%).

A análise de regressão do tratamento hexânico (Figura 2) indicou que a melhor equação foi a quadrática ($R^2 = 0,93$), com incremento na indução de fitoalexinas diretamente proporcional à concentração utilizada, sendo que o maior valor alcançado foi 1,78 de absorvância $\text{min}^{-1}\text{g.p.f.}^{-1}$ com a concentração de 750 mg L^{-1} , 270% superior a testemunha negativa água + Tween 20 (0,5%). Já para os tratamentos diclorometânico e etanólico a análise de regressão não foi significativa, isto é, a flutuação dos dados da síntese de fitoalexinas não é influenciada pela concentração utilizada. Os maiores valores para estes tratamentos foram 0,29 e 0,61 de absorvância $\text{min}^{-1}\text{g.p.f.}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1).

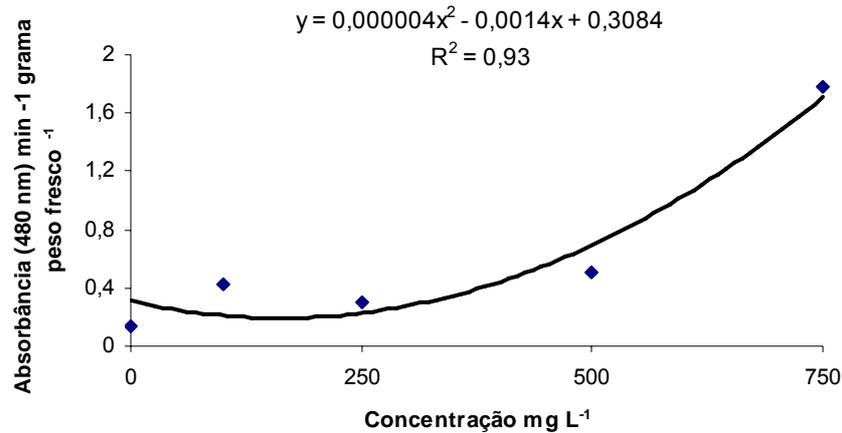


Figura 2. Indução de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento com extrato de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* obtido em hexano. Dados em absorbância por minuto por grama de peso fresco.

Tabela 1. Indução de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano

Extratos	Concentrações (mg L ⁻¹)			
	100	250	500	750
Hexano	0,42 ^b =	0,29 ^a =	0,51 ^a =	1,78 ^a ^{ns} >
Etanol	0,61 ^a ^{ns} =	0,17 ^a =	0,27 ^a =	0,29 ^b =
Diclorometano	0,17 ^b =	0,14 ^a =	0,29 ^a =	0,28 ^b =
ASM** (testemunha positiva)				2,91
Água destilada + Tween 20 (0,5%) (testemunha negativa)				0,14

* Valores representam a absorbância (480 nm) grama de peso fresco⁻¹;

** Acibenzolar-S- metil (100 mg i.a. L⁻¹);

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

^(ns): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%);

⁽⁺⁾ e ⁽⁻⁾: diferenças significativas da testemunha ASM, sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

= : sem diferença significativa da testemunha água destilada + Tween 20 (0,5%) (Dunnett 5%);

> e < : diferenças significativas da testemunha água destilada + Tween 20 (0,5%), sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

Para outros Basidiomicetos também se tem verificado a capacidade de indução de fitoalexinas. Fiori-Tutida (2003) observou que os extratos brutos dos

cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* possuem atividade eliciadora de fitoalexinas (deoxiantocianidinas) em mesocótilos de sorgo. O gênero *Lentinula* alcançou 2,5 de absorvância mg.p.f.⁻¹ na concentração mais alta (40.000 mg L⁻¹) e o gênero *Agaricus* atingiu 2,6 de absorvância mg.p.f.⁻¹ (10.000 mg L⁻¹), sendo estatisticamente diferentes e superiores à testemunha (água destilada esterilizada). Não há na literatura nenhum relato sobre o potencial indutor de fitoalexinas em sorgo por *P. sanguineus*.

4.2 Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja

Através da análise de variância, em nível de 5% de probabilidade, não se observou diferenças significativas no teste F (tratamentos entre si e com as testemunhas) em todos os extratos orgânicos testados para a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja, como também não houve um ajuste significativo dos dados a uma curva de regressão.

Tabela 2. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano

Extratos	Concentrações (mg L ⁻¹)			
	100	250	500	750
Hexano	0,032 ^{*ns=}	0,025 ^{ns=}	0,030 ^{ns=}	0,032 ^{ns=}
Etanol	0,023 ^{ns=}	0,035 ^{ns=}	0,044 ^{ns=}	0,026 ^{ns=}
Diclorometano	0,031 ^{ns=}	0,037 ^{ns=}	0,028 ^{ns=}	0,025 ^{ns=}
ASM** (testemunha positiva)				0,031
Água destilada + Tween 20 (0,5%) (testemunha negativa)				0,031

* Valores representam a absorvância (285 nm) grama de peso fresco⁻¹;

** Acibenzolar S- metil (100 mg i.a. L⁻¹);

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

(^{ns}): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%);

= : sem diferença significativa da testemunha água destilada + Tween 20 (0,5%) (Dunnett 5%).

As médias dos tratamentos do experimento de indução de fitoalexinas em cotilédones de soja não diferiram significativamente da média da testemunha negativa (água + Tween 20) e/ou da testemunha positiva (ASM). Em trabalho com

extratos provenientes de folhas da planta medicinal *Adiantum capillus-veneris* (avenca), Meinerz et al. (2007) também constataram que o tratamento com ASM (125 mg i.a. L⁻¹) não promoveu indução de fitoalexinas, em cotilédones de soja, superior à testemunha água.

Pode-se concluir, que a média da produção de fitoalexinas foi maior em mesocótilos estiolados de sorgo (0,44 de absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹) do que em cotilédones de soja (0,031 de absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹). Essa comparação está de acordo com os resultados de Piccinin (2000), que utilizou diferentes formulações de *L. edodes* (filtrado de basidiocarpo autoclavado, filtrado de estipe, filtrado autoclavado de basidiocarpo) e constatou maior acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo do que em cotilédones de soja.

Fiori-Tutida (2003) observou resultados diferentes deste trabalho, verificando que os extratos brutos dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei* possuem atividade eliciadora de fitoalexinas em cotilédones de soja. O gênero *Agaricus* proporcionou um maior acúmulo de fitoalexinas gliceolinas (0,41 de absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹) do que o gênero *Lentinula* (0,16 de absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹). Já para mesocótilos de sorgo, o gênero *Lentinula* proporcionou maior acúmulo de fitoalexinas do que *Agaricus*.

Mesmo que alguns extratos de *P. sanguineus* tenham promovido o acúmulo de fitoalexinas neste experimento, atuando como eliciadores, não significa que esta produção poderá proteger as plantas de sorgo e soja em seus respectivos patossistemas. Hammerschmidt (1999a; 1999b), ressaltou que as fitoalexinas têm gerado informações úteis sobre o metabolismo secundário, regulação de genes e química do metabolismo secundário. Porém, algumas questões ainda precisam ser respondidas: As fitoalexinas são importantes para a defesa das plantas? Se forem, em que grau? Ou ainda, existe a dúvida se elas podem ser apenas o produto final do metabolismo das plantas que sofreram uma agressão do patógeno, sendo que este por sua vez, desviou a produção de carbono para formar compostos que são “acidentalmente” antimicrobianos.

Segundo Hammerschmidt (1999b) e Van Loon et al. (1998) a atual definição de fitoalexinas não inclui qualquer critério que permita a discriminação entre o papel das fitoalexinas na defesa *versus* apenas uma resposta à infecção. Contudo, boas evidências para o seu papel na defesa das plantas existem, como exemplo pode-se citar: a) a localização e o tempo de acúmulo de fitoalexinas no tecido infectado em

relação ao desenvolvimento do patógeno; b) forte correlação positiva de produção rápida de fitoalexinas com interações incompatíveis no sistema gene-a-gene de planta-patógeno; c) associação de acúmulo rápido de fitoalexinas com genes de resistência que condicionam uma rápida restrição do desenvolvimento do patógeno; d) uso de inibidores metabólicos que aumentam a suscetibilidade e bloqueiam a produção de fitoalexinas; e) uma relação positiva entre a virulência do patógeno e a tolerância as fitoalexinas; f) um aumento da resistência do tecido da planta através do estímulo de produção de fitoalexinas antes da inoculação com o patógeno.

Metabólitos de defesa constitutivos (pré-formados) também são encontrados em espécies que sintetizam fitoalexinas, indicando que a produção desta faz parte das diversas estratégias de defesa selecionadas ao longo da evolução, podendo ou não ser o principal mecanismo de resistência de uma determinada espécie vegetal (STICHER et al., 1997).

A produção de fitoalexinas sofre a influência de diversos fatores, como umidade, disponibilidade de água e temperatura. Em plantas nativas crescendo em ambiente natural, como *Tocoyena formosa* (Rubiaceae), uma espécie do cerrado, a síntese de fitoalexinas varia nas diferentes estações do ano, sugerindo uma adaptação do sistema de defesa às flutuações ambientais (BRAGA et al., 1991).

4.3 Atividade de peroxidases em mesocótilos estiolados de sorgo

Com a realização de uma análise de variância, pode-se concluir pelo teste F (5% de probabilidade), que os dados não diferiram significativamente entre si e também não diferiram da testemunha positiva e/ou negativa (Tabela 3).

Com relação ao extrato hexânico a maior atividade de peroxidases foi com a concentração de 250 mg L⁻¹ (2,98 absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹), obtendo valor médio de 2,77 absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹. O extrato etanólico revelou uma diminuição na atividade de peroxidases proporcional ao aumento da concentração utilizada. A produção média de peroxidases foi de 2,08 absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹. Já para o extrato diclorometânico houve uma supressão da atividade de peroxidases a partir da concentração de 100 mg L⁻¹, apresentando a menor média (1,96 absorvância min⁻¹ g.p.f.⁻¹), em comparação aos outros dois extratos.

Ao realizar uma análise de variância entre cada uma das concentrações testadas nos diferentes extratos (Tabela 3), pode-se notar através do teste de Tukey a 5% de probabilidade que, nenhuma média diferiu estatisticamente entre si e entre as testemunhas, exceto o extrato diclorometânico com 250 mg L⁻¹, que se apresentou estatisticamente inferior à testemunha ASM. Mesmo sem diferenças estatísticas, 20% dos tratamentos apresentaram valores maiores do que a testemunha positiva.

Tabela 3. Atividade de peroxidases em mesocótilos estiolados de sorgo pelo tratamento em extratos de *Pycnopus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano

Extratos	Concentrações (mg L ⁻¹)			
	100	250	500	750
Hexano	2,51 ^a * ^{ns} =	2,98 ^a ^{ns} =	2,76 ^a ^{ns} =	2,84 ^a ^{ns} =
Etanol	2,21 ^a ^{ns} =	1,94 ^{ab} ^{ns} =	2,18 ^a ^{ns} =	1,99 ^a ^{ns} =
Diclorometano	2,58 ^a ^{ns} =	1,56 ^b ⁻ =	1,91 ^a ^{ns} =	1,80 ^a ^{ns} =
ASM (testemunha positiva)**				2,74
Água destilada + Tween 20 (0,5%) (testemunha negativa)				2,58

* Valores representam a variação nas unidades de absorvância (470 nm) min⁻¹ grama peso fresco⁻¹;

** Acibenzolar-S- metil (100 mg i.a. L⁻¹);

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

^(ns): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%);

⁽⁺⁾ e ⁽⁻⁾: diferenças significativas da testemunha ASM, sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

= : sem diferença significativa da testemunha água destilada + Tween 20 (0,5%) (Dunnett 5%).

4.4 Atividade de peroxidases em cotilédones de soja

Para os três extratos orgânicos testados não houve um ajuste significativo dos dados à uma curva de regressão, isto significa que a atividade de peroxidases não é influenciada e/ou dependente da dose. Através da análise de variância entre os extratos (análise qualitativa) pôde-se notar que não houve diferenças significativas pelo teste F ($P \leq 0,05$) dos valores entre si e entre as testemunhas (Tabela 4).

O extrato hexânico obteve máxima atividade de peroxidases com a menor concentração utilizada (3,96 absorvância $\text{min}^{-1} \text{g.p.f.}^{-1}$). O tratamento com etanol indicou uma supressão da atividade de peroxidases proporcional ao aumento da concentração utilizada e obteve uma média de 4,06 absorvância $\text{min}^{-1} \text{g.p.f.}^{-1}$. Em relação aos dados obtidos com o extrato diclorometânico, verificou-se a maior atividade de peroxidases observada no experimento (5,16 absorvância $\text{min}^{-1} \text{g.p.f.}^{-1}$) na concentração de 100 mg L^{-1} de *P. sanguineus*, superando a testemunha ASM em 30%. O ponto de mínima atividade foi em 500 mg L^{-1} , com 3,38 de absorvância $\text{min}^{-1} \text{g.p.f.}^{-1}$.

Ao realizar a análise de variância entre as concentrações (análise quantitativa) pôde-se verificar que o teste de Tukey não acusou significância ao nível de 5% de probabilidade, para os dados entre si e com as testemunhas (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade de peroxidases em cotilédones de soja pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano

Extratos	Concentrações (mg L^{-1})			
	100	250	500	750
Hexano	3,96 ^a ^{ns=}	3,10 ^a ^{ns=}	3,68 ^a ^{ns=}	3,27 ^a ^{ns=}
Etanol	4,49 ^a ^{ns=}	4,21 ^a ^{ns=}	3,73 ^a ^{ns=}	3,80 ^a ^{ns=}
Diclorometano	5,16 ^a ^{ns=}	3,91 ^a ^{ns=}	3,38 ^a ^{ns=}	4,33 ^a ^{ns=}
ASM** (testemunha positiva)				3,95
Água destilada + Tween 20 (0,5%) (testemunha negativa)				3,44

* Valores representam a variação das unidades de absorvância (470 nm) $\text{min}^{-1} \text{grama}$ peso fresco⁻¹;

** Acibenzolar-S- metil ($100 \text{ mg i.a. L}^{-1}$);

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

(^{ns}): sem diferença significativa das testemunhas positiva e negativa (Dunnett 5%);

= : sem diferença significativa da testemunha água destilada + Tween 20 (0,5%) (Dunnett 5%).

Em relação ao experimento com atividade de peroxidases, pode-se concluir que houve maior indução pelos extratos de *P. sanguineus* em cotilédones de soja do que em mesocótilos de sorgo. O valor mínimo de atividade de peroxidases em cotilédones de soja foi 100% maior do que o valor mínimo produzido em mesocótilos de sorgo.

Estas peroxidases participam do processo de lignificação de células vegetais, podendo com isso, afetar o desenvolvimento fúngico através de barreiras físicas, bloqueando o desenvolvimento do patógeno, reduzindo a difusão de nutrientes para o fungo ou levando à síntese de precursores de lignina tóxicas ao fungo.

Assi (2005) em seu trabalho analisou peroxidases em plantas de feijão tratadas com extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* e concluiu que houve ativação de mecanismos de defesa, principalmente para extrato em concentração de 20%, através de incremento local e sistêmico na atividade e atividade específica de peroxidases, o que pode ter contribuído para a redução da severidade causada por *Colletotrichum lindemuthianum*.

Com relação à atividade específica de peroxidase em cotilédones de soja, a análise de variância (qualitativa) dos extratos hexânico e diclorometânico não demonstrou significância pelo teste F (5% de probabilidade), porém o extrato etanólico obteve diferença significativa da testemunha positiva e negativa (Tabela 5).

Pôde-se observar um incremento na atividade específica para o extrato hexânico proporcional ao aumento da concentração, mas sem um ajuste significativo da regressão. Na concentração de 500 mg L⁻¹ observou-se o pico de atividade específica, com 2,48 de absorvância min⁻¹ µg de proteína⁻¹.

O tratamento com extrato etanólico demonstrou uma inibição da atividade específica de peroxidase proporcional ao aumento da concentração utilizada. Os dados da regressão se ajustaram a uma equação linear, com o R² de 0,91 (Figura 3). Para as concentrações de 500 e 750 mg L⁻¹ a atividade específica foi significativamente inferior à obtida no tratamento com ASM e com água + Tween 20 (0,5%) (teste de Dunnett, 5% probabilidade).

Pôde-se observar com o extrato diclorometânico o maior valor de atividade específica (concentração de 250 mg L⁻¹, 2,68 de absorvância min⁻¹ µg de proteína⁻¹) superando a testemunha ASM em 30%. Novamente a análise de regressão não foi significativa.

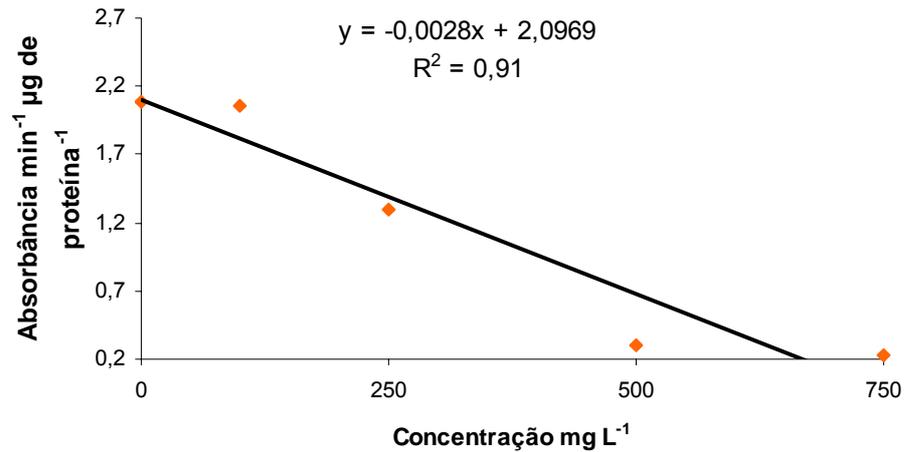


Figura 3. Atividade específica de peroxidases em cotilédones de soja induzida pelo tratamento com extrato de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* obtido em etanol. Dados em absorvância por minuto por micrograma de proteína.

O teste de Tukey ($P \leq 0,05$) das concentrações 500 e 750 mg L⁻¹ (análise quantitativa) demonstrou que os extratos hexânico e diclorometânico não diferiram das testemunhas positiva e negativa, porém diferiram estatisticamente do extrato etanólico, com valores até 9 vezes maior para estas concentrações (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade específica de peroxidases em cotilédones de soja pelo tratamento em extratos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos em hexano, etanol e diclorometano

Extratos	Concentrações (mg L ⁻¹)			
	100	250	500	750
Hexano	1,35*b ⁻ =	1,13a ^{ns} =	2,48a ^{ns} =	2,10a ^{ns} =
Etanol	2,06ab ^{ns} =	1,29a ^{ns} =	0,30b ⁻ <	0,23b ⁻ <
Diclorometano	2,45a ^{ns} =	2,68a ^{ns} =	2,34a ^{ns} =	2,54a ^{ns} =
ASM** (testemunha positiva)				2,07
Água destilada + Tween 20 (0,5%) (testemunha negativa)				2,08

* Valores representam a variação das unidades de absorvância (470 nm) min⁻¹ µg⁻¹ de proteína⁻¹;

** Acibenzolar-S- metil (100 mg i.a. L⁻¹);

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;
(^{ns}): sem diferença significativa da testemunha ASM (Dunnett 5%);

(⁺) e (⁻): diferenças significativas da testemunha ASM, sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

= : sem diferença significativa da testemunha água destilada + Tween 20 (0,5%) (Dunnett 5%);

> e < : diferenças significativas da testemunha água destilada + Tween 20 (0,5%), sendo superior ou inferior a esta, respectivamente.

Como descrito anteriormente, Assi (2005) também obteve incremento na atividade específica de peroxidases, pelo tratamento com extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, porém em plantas de feijão. Na literatura não há nenhum relato sobre a influência de extratos de *P. sanguineus* na atividade de peroxidases em sorgo e soja.

5 CONCLUSÕES

1 Os extratos orgânicos diclorometânico, hexânico e etanólico de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* não possuem atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja, mas indicam a síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

2 Os extratos orgânicos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, diclorometânico para sorgo e soja e etanólico para soja, inibem a atividade de peroxidase, enquanto que o extrato hexânico promove a atividade para sorgo e a atividade específica para soja.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B.; BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v.95, p.269-273, 1991.

ANKE, T. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites, **Progress in Industrial Microbiology**, v.27, p.51-66, 1989.

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.940-945, 1995.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.235-241, 1992.

ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L.ex Fr.)**. Marechal Cândido Rondon, 2005. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Setembro/2005.

AYERS, A.R., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology**, v. 57, p.751-759. 1976.

BENEDICT, R.G., BRADY, L.R. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.61, p.1820-1822, 1972.

BHAGWATH, S.G.; HJORTSO, M.A. Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine. A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p.159–167, 2000.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: Noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap. 1, p.11-28, 2005.

BOSE, S.R. Antibiotics in a Polyporus (*Polystictus sanguineus*), **Nature**, v.158, p.292-296, 1946.

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.

BRAGA, M.R.; YANG, M.C.M.; DIETRICH, S.M.C & GOTTLIEB, O.R. Phytoalexin induction in Rubiaceae. **Journal of Chemical Ecology**, n.17, p.1079-1090, 1991.

BRIZUELA, M.A.; GARCÍAN, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários, **Revista Iberoamericana de Micología**, Revisão, v.15, p.69-74, 1998.

BURDEN, R.J.; BAILEY, J.A. Structure of the phytoalexin from soybean. **Phytochemistry**, v.14, p.1389-1390, 1975.

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

DI PIERO, R.M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos**. Piracicaba – SP, 2003. 157 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003.

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

DI PIERO, R.M.; WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.169-174, 2006.

FIDALGO, O. Conhecimento micológico dos índios brasileiros. **Rickia**, v.2, p.1-10, 1965.

FIORI-TUTIDA, A.C.G. **Uso de extratos dos Cogumelos *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinem no controle *in vitro* de *Puccinia recondita* f. sp *tritici* e na indução de resistência em trigo à *Bipolaris sorokiniana***. Maringá, 2003. 112 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, 2003.

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v.11, p.283-332, 2003.

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

HALAOULI, S.; ASTHER, M.I.; KRUIIS, K.; GUO, L.; HAMDI, M.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; LOMASCOLO, A. Characterization of a new tyrosinase from

Pycnoporus species with high potential for food technological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 332-343(12), February 2005.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, n.2, p.77-84, 1999a.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p.285-306, 1999b.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation, **Mycology Research**, v.95, p.641-655, 1991.

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

HIPSKIND, J.; HANAU, R.; LEITE, B.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of an apigeninidin acyl ester. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, p.381-396, 1990.

ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.206-210, 2001.

JAGPAT, V.; BHARGAVA, S. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *sorghum bicolor* (L.) Moench. Exposed to high light, low water and high temperature stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, p.195-197, 1995.

KOBAYASTI, L.; SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; SOUZA, R.M.; REZENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito "in vitro" do indutor de resistência Acibenzolar-S-Methyl sobre bactérias patogênicas ao tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, Suplemento, p.293-293, 2001.

KRUGNER, T.L.; BACHI, L.M.A. Fungos em BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia – Princípios e conceitos**. Vol. 1. São Paulo: Ceres, p.46-96, 1995.

KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.275-297, 1995.

LABANCA, E.R. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002. p. 107. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002.

LAGRIMINI, L.M.; BURKHART, W.; MOYER, M.; ROTHSTEIN, S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidases from

tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA v. 84, p.7542-7546, Botany, November, 1987.

LEMBERG, R. Nitrogenous pigments from the fungus *Coriolus sanguineus* (*Polystictus cinnabarinus*). **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 30, p.271-278, 1952.

LEPP, H. **Cosmopolitan and pan-tropical species**. Australian National Botanic Gardens, Fungi Web Site: <http://www.anbg.gov.au/fungi/mycogeography-cos-pan.html>. Acesso em 22/12/05.

LO, S.C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.1, p.21-31, 1996.

LOPEZ, A.M.Q. Fitoalexinas em sorgo – papel na interação com fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.59-61, 1993.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V.L.R. Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista Microbiológica**, v.30, p.77-84, 1999.

MCKENZIE, D. The development of Acibenzolar-S-Methyl (ASM) for use in crop management. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.256-256, Suplemento, 2001.

MEINERZ, C.C.; FORMIGHIERI, A.P.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R. Atividade elicitora de fitoalexinas em soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris*). **Summa Phytopathologica**, v.33 (suplemento), p.66, 2007.

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

NICHOLSON, R.L., KOLLIPARA, S.S., VINCENT, J.R., LYONS, P.C. & CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy Science**, v.84. p.5520-5524. August, 1987.

NICHOLSON, R.L., JAMIL, F.F., SNYDER, B.A., LUE, W.L. & HISPkind, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33, p.271-278. 1988.

NOBLES, M.K.; FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, v.40, p.987-1016, 1962.

OLIVEIRA, J.M.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; MANTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*, **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.1775–1780, 2002.

OSSWALD, W.F.; STANGARLIN, J.R.; NICHOLSON, R.L.; BRUMMER, M.; WULFF, N.A.; DI PIERO, R.M.; PICCININ, E.; DI CIERO, L.; HOTO, F.V.; PASCHOLATI, S.F. The effect of Acibenzolar-S-methyl on phytoalexins and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineonum*. **Summa Phytopathologica**, v.30, n.4, p.415-420, 2004.

PACCOLA, A.S.; MAKI, C.S.; NOBREGA, G.M.A.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Antagonistic effect of edible mushrooms extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.176-178, 2001.

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 às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.1-51, 1994.

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

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

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT’ANNA, R.; MOSQUIM, R.; MOREIRA, M.A. Aluminium effect on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-142, 1999.

PÉREZ-SILVA, E., E. AGUIRRE-ACOSTA Y C. PÉREZ-AMADOR. Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en México. **Revista Mexicana de Microbiología**, v.4, p.137-144, 1988.

PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível “shiitake” (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. Piracicaba, 2000. 160 p. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, 2000.

RESENDE, M.L.V.; MACHADO, J. da C. **Manejo de doenças em pós-colheita de produtos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

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

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 98(7), p. 967-974, October, 2003.

ROMEIRO, R.S. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. Viçosa, UFV. **Cadernos Didáticos**, n. 56, 1999.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Fórum Micológico, v.17, p.73-81, 2000.

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.8, p.S54-S56, 2003. Suplemento.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência em CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.125-138, 2005.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; REZENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do Acibenzolar-S-Methyl (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.294-295, Supl., 2001.

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

SIQUEIRA, E.M. de A.; MIZUTA, K.; GIGLIO, J.R. *Pycnopus sanguineus*: a novel source of [alpha]-amylase. **Mycological Research**, v.101, p.188-190. Cambridge University Press, 1997.

SMÂNIA, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by fungus *Pycnopus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, n.45, p.177-181, 1995a.

SMÂNIA, A.; SMÂNIA E.F.A.; CRUZ, F.S.; BENCHETRIT, L.C. Growth and production phases of cinnabarin synthesis by *Pycnopus sanguineus*, **Revista de Microbiologia**, v.26, p.302-306, 1995b.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M.L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnopus sanguineus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.70, p.57-59, 1997.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR, A.; LEITE, C.L. Cinnabarin synthesis by *Pycnopus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.4. São Paulo, Outubro/Dezembro 1998.

SMÂNIA, A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA, E.F.A.; CUNEO, R.S. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllphoro-mycetideae) Fruit body. **Internacional Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, p.325-330, 1999.

SMÂNIA JR, A.; MARQUES, C.J.S.; SMÂNIA, E.F.A.; ZANETTI, C.R.; CAROBREZ, S.G.; TRAMONTE, R.; LEITE, C.L. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Phytotherapy Research**, n.17, p.1069-1072. 2003.

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

SNYDER, B., NICHOLSON, R.L. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site response to fungal ingress, *Science*, v. 248, p.1637-1639, 1990.

SOMSSICH, J.E.; HAHLBROCK, K. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, v.3, n.3, p.86-90, 1998.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserobolium turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phythopatologica**, v.20, p.16-21, 1994.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas Mediciniais – Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, ano II, n.11, p.16-21, 1999.

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

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, **Biochimie**, v. 75, p.687-706, 1993.

SUAY, I.; ARENAL, F.; ASENSIO, F.J.; BASILIO, A.; CABELLO, M.A.; DÍEZ, M.T.; GARCÍA, J.B.; VAL, A.G.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; PELÁEZ, F.; VICENTE, M.F. Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities, **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p.129 - 139, 2000.

TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L.F.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, p.4158-4163, 1995.

VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p.453-483, 1998.

VIGO, S.C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Indução de gliceolina em soja e inibição da germinação de conídios de *Microsphaera diffusa* pela tritura vegetal de *Pfaffia glomerata*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26 (suplemento), p.351, 2001.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, n.3, p.258-274, 2002.

WULFF, N.A. & PASCHOLATI, S.F. Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n.3, p.428-435. 1999.

WULFF, N.A., PASCHOLATI, S.F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v.55, n.1, p.138-143, 1998.

YAMAOKA, N.; LYONS, P.C.; HIPSKIND, J.; NICHOLSON, R.L. Elicitor of sorghum phytoalexin synthesis from *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.37, p.255-270, 1990.

ZIEGLER, E. & PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.321-331, 1982.

ZJAWIONY, J.K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. **Journal of Natural Products**, v.67, n.2, p.300-310, 2004.

ZULFADHLY, Z.; MASHITAH, M.D.; BHATIA, S. Heavy metals removal in fixed-bed column by the macro fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Environmental Pollution**, v.112, p.463-470, 2001.