

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

CLAIR APARECIDA VIECELLI

**CONTROLE DA MANCHA ANGULAR E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE
RESISTÊNCIA EM FEIJOEIRO TRATADO COM EXTRATOS DE
*Pycnoporus sanguineus***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
JANEIRO/2008

CLAIR APARECIDA VIECELLI

**CONTROLE DA MANCHA ANGULAR E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE
RESISTÊNCIA EM FEIJOEIRO TRATADO COM EXTRATOS 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
JANEIRO/2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção recebida, acompanhada de força, luz e coragem para enfrentar os obstáculos da vida nos caminhos que escolhi.

A Nossa Senhora Aparecida, pela sua intercessão.

A minha mãe (*in memoriam*), que nos momentos difíceis senti sua presença mais perto de mim como nunca. Ao meu pai e meus irmãos pelo exemplo da persistência.

Ao meu marido, Nelson, que foi compreensivo pelas vezes que estive ausente, por acreditar em mim e me apoiar neste grande sonho.

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin, exemplo de organização e ética profissional, pela oportunidade, paciência e orientação para a conclusão deste trabalho.

Ao prof. Dr. Odair José Kuhn, pela colaboração no desenvolvimento deste projeto.

A prof. MSc Claudia T. A. da Cruz Silva e ao prof. Dr. Renato Cassol de Oliveira, pela amizade e incentivo durante o mestrado.

A Unioeste, pelo programa de pós-graduação. Por disponibilizar a estrutura, laboratório e todo o material necessário para a conclusão da pesquisa.

A Fag, por disponibilizar a casa de vegetação e a área a campo para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do laboratório da Unioeste e Fag: Gilmar, Luciana, Sandra, Mauriceli, Cris, Erica, Ariane, Silvia, Elaine C., Tati, Franciele, Jhony, Eliseu, Elaine K. e Suzana pela companhia e apoio durante as análises.

Expresso reconhecimento a todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO.....	12
2.2 DOENÇAS DO FEIJOEIRO	12
2.2.1 Mancha angular - <i>Pseudocercospora griseola</i> (Sacc.) Crous & Braun.....	13
2.2.1.1 Sintomas.....	13
2.2.1.2 Etiologia.....	14
2.2.1.3 Controle.....	14
2.3 CONTROLE DE DOENÇAS.....	14
2.3.1 Controle alternativo de doenças.....	15
2.3.1.1 Indução de resistência.....	15
2.3.1.1.1 Alterações bioquímicas da indução de resistência	16
2.3.1.1.1.1 Peroxidase	16
2.3.1.1.1.2 Polifenoloxidase	17
2.3.1.1.1.3 β -1,3-glucanase.....	17
2.3.1.1.2 Alterações fisiológicas da indução de resistência	18
2.3.1.1.2.1 Proteínas	18
2.3.1.1.2.2 Clorofilas	19
2.3.1.2 Indutores de resistência	19
2.3.2 Potencial de cogumelos no controle de doenças	20
2.3.2.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE <i>P. griseola</i>	23
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE BASIDIOCARPOS DE <i>P. sanguineus</i>	23
3.3 OBTENÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE <i>P. sanguineus</i>	23

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i>	24
3.4.1 Inibição de crescimento micelial	24
3.4.2 Inibição de esporulação.....	24
3.4.3 Inibição de germinação de esporos.....	25
3.5 MATERIAL VEGETAL	26
3.5.1 Cultivo em casa de vegetação	26
3.5.1.1 Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação	26
3.5.2 Cultivo a campo.....	27
3.5.2.1 Aplicação dos tratamentos a campo	27
3.5.3 Avaliação da severidade	28
3.6 COLETA DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	28
3.6.1 Obtenção dos extratos protéicos.....	29
3.6.2 Atividade de peroxidase	29
3.6.3 Atividade de polifenoloxidase	29
3.6.4 Atividade de β -1,3 glucanase	30
3.6.5 Teor de proteína.....	30
3.6.6 Teor de clorofila.....	31
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i>	32
4.1.1 Inibição de crescimento micelial.....	32
4.1.2 Inibição de esporulação.....	33
4.1.3 Inibição de germinação de esporos.....	34
4.2 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE EM CASA DE VEGETAÇÃO	35
4.3 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE A CAMPO.....	36
4.4 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	38
4.4.1 Atividade de peroxidase	38
4.4.2 Atividade de polifenoloxidase	41
4.4.3 Atividade de β -1,3 glucanase	43
4.5 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICOS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	45
4.5.1 Teor de proteína.....	45
4.5.2 Teor de clorofila a.....	47

4.5.3 Teor de clorofila <i>b</i>	49
4.5.4 Teor de clorofila total	51
5 CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Basidiocarpos de <i>Pycnoporus sanguineus</i> . Fonte: o autor	21
Figura 2	Inibição <i>in vitro</i> do crescimento micelial de <i>Pseudocercospora griseola</i> em função do tratamento com extrato aquoso de micélio de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , esterilizado por filtração em membrana Millipore.	32
Figura 3	Efeito dos extratos de micélio de <i>P. sanguineus</i> sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>P. griseola</i> . (A) autoclavado e (F) filtrado em membrana Millipore	33
Figura 4	Inibição <i>in vitro</i> da esporulação de <i>Pseudocercospora griseola</i> em função do tratamento com extrato aquoso de micélio de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , esterilizado por filtração em membrana Millipore.....	34
Figura 5	Inibição <i>in vitro</i> da germinação de esporos de <i>Pseudocercospora griseola</i> em função do tratamento com extrato aquoso de micélio de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , esterilizado por filtração em membrana Millipore.	35
Figura 6	Atividade de peroxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com <i>Pseudocercospora griseola</i> três dias após os tratamentos com os extratos aquosos de <i>P. sanguineus</i>	40
Figura 7	Atividade de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com <i>Pseudocercospora griseola</i> três dias após os tratamentos com os extratos aquosos de <i>P. sanguineus</i>	42
Figura 8	Atividade de β -1,3-glucanase em plantas de feijoeiro inoculadas com <i>Pseudocercospora griseola</i> três dias após os tratamentos com os extratos aquosos de <i>P. sanguineus</i>	44
Figura 9	Teor de proteína em plantas de feijoeiro inoculadas com <i>Pseudocercospora griseola</i> três dias após os tratamentos com os extratos aquosos de <i>P. sanguineus</i>	46
Figura 10	Teor de clorofila <i>a</i> em plantas de feijoeiro inoculadas com <i>Pseudocercospora griseola</i> três dias após os tratamentos com os extratos aquosos de <i>P. sanguineus</i>	48
Figura 11	Teor de clorofila <i>b</i> em plantas de feijoeiro inoculadas com <i>Pseudocercospora griseola</i> três dias após os tratamentos com os extratos aquosos de <i>P. sanguineus</i>	50
Figura 12	Teor de clorofila total em plantas de feijoeiro inoculadas com <i>Pseudocercospora griseola</i> três dias após os tratamentos com os extratos aquosos de <i>P. sanguineus</i>	52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus*, na terceira folha tratada e na quarta folha apenas inoculada, em condições de casa de vegetação 36
- Tabela 2 Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus*, em condições de campo..... 38

RESUMO

O controle alternativo de doenças de plantas visa minimizar impactos ambientais por meio da utilização de produtos naturais. Com a possibilidade de utilizar extratos de *Pycnoporus sanguineus* no controle de fitopatógenos, realizou-se esse trabalho com o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Pseudocercospora griseola* e a indução de enzimas de defesa em feijoeiro como peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase e ativação de mecanismos fisiológicos relacionados ao fornecimento de energia, como proteínas e clorofilas. Os experimentos *in vitro* e em casa de vegetação foram constituídos pelos extratos do basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus*, além dos controles água, acibenzolar-S-metil (ASM: 75 mg i.a. L⁻¹) e fungicida (azoxystrobin: 40 mg i.a. L⁻¹). *In vitro* o extrato de micélio esterilizado por filtração inibiu significativamente o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de esporos de *P. griseola* a partir da concentração 5%, o que não ocorreu no extrato esterilizado em autoclave, indicando a presença de compostos termoláveis. Em casa de vegetação, plantas de feijão foram tratadas três dias antes da inoculação do patógeno, avaliando-se a severidade e a atividade de enzimas envolvidas no processo de defesa, na 3^o folha tratada bem como na 4^o folha não tratada, para verificar a ocorrência da resistência local e/ou sistêmica respectivamente. A severidade em casa de vegetação foi reduzida na 3^a folha em 82,4 e 77% e na 4^a folha em 71,6 e 69,4% com os extratos de *P. sanguineus* em concentrações de 10% e 20%, respectivamente. A campo, reduções de até 19,2% e 63,8% na 1^a e 2^a aplicação, respectivamente, foram observadas, em relação ao controle água. A atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, o teor de proteínas e clorofilas foram maiores nas plantas tratadas com os extratos de *P. sanguineus*. Estes resultados indicam a eficiência de *P. sanguineus* para o controle alternativo da mancha angular do feijoeiro.

Palavras-chave: Indução de resistência, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Phaeoisariopsis griseola*.

ABSTRACT

The alternative control of plants disease aims to minimize ambient impacts by the use of natural products. With the possibility of using *Pycnoporus sanguineus* extracts for the control of pathogenic fungus, this work was conducted to verify the antimicrobial activity *in vitro* against *Pseudocercospora griseola* and the induction of enzyme defense in bean plant as peroxidase, polyphenol oxidase and β -1,3-glucanase and activation of physiological mechanisms related to the energy supply, as proteins and chlorophyll. The experiments *in vitro* and in greenhouse had been constituted by extracts from basidiocarps, mycelium and liquid medium culture filtrate of *P. sanguineus*. Water, acibenzolar-S-methyl (ASM: 75 mg i.a. L⁻¹) and fungicide (azoxystrobin: 40 mg i.a. L⁻¹) were the control treatments. *In vitro*, the extract of mycelium at 5%, sterilized by filtration, significantly inhibited the mycelial growth, sporulation and conidia germination of *P. griseola*, what did not occur in the extract sterilized in autoclave, indicating the presence of thermo-sensible compounds. In greenhouse, bean plants had been treated three days before the inoculation with the pathogen and were evaluated the severity and the activity of plant defense enzymes peroxidase, β -1,3-glucanase and polyphenol oxidase in 3rd leaves treated as well as in 4th leaves not treated, to verify the occurrence of local or systemic resistance induction, respectively. Severity was reduced in 82.4% and 77% in 3rd leaves and in 71.6% and 69.4% in 4th leaves to *P. sanguineus* extracts at concentrations of 10% and 20%, respectively. In the field, severity was reduced in 19.2% and 63.8% in 1st and 2nd application, respectively, in relation to the control water. The activities of peroxidase, polyphenol oxidase, proteins and chlorophylls had an increment in plants treated with extracts. These results indicate the potential of *P. sanguineus* for alternative control of the angular leaf spot in bean plants.

Key words: Induced resistance, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Phaeoisariopsis griseola*.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é suscetível a muitas doenças que ocorrem durante seu ciclo, causando perdas acentuadas na produtividade. As características climáticas da região Oeste do Paraná favorecem a ocorrência de várias doenças que causam prejuízos aos agricultores, como a mancha angular, causada por *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun (sin. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris), patógeno da parte aérea da planta que representa uma das principais doenças do feijoeiro.

Tradicionalmente o controle da mancha angular tem sido feito com o emprego de cultivares resistentes, sementes livres de patógenos e aplicação de fungicidas. Este último, a curto prazo, tem suas vantagens mas a longo prazo pode causar problemas devido aos resíduos acumulados (GHINI & KIMATI, 2000) e, em função disso, é necessário desenvolver métodos alternativos de controle de doenças como a indução de resistência em plantas.

A indução de resistência em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes eliciadores (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997). Agentes eliciadores são moléculas capazes de ativar um mecanismo de defesa na planta, protegendo-a contra infecção subsequente por patógenos. Entre os eliciadores não convencionais podem-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais e os extratos obtidos de cogumelos.

Entre os cogumelos com propriedades eliciadores destaca-se *Pycnoporus sanguineus*, utilizado desde a medicina popular ao controle alternativo de doenças de plantas, com potencial para a indução de resistência, tornando-se promissor em pesquisas relacionadas.

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivos, investigar o potencial de *P. sanguineus* no controle da mancha angular do feijoeiro, através de avaliações da atividade antimicrobiana direta contra *P. griseola*, da indução de enzimas de resistência como peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase e da ativação de mecanismos fisiológicos relacionados ao fornecimento de energia, como proteínas e clorofilas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro é considerado como uma das mais importantes leguminosas comestíveis e encontra-se distribuído desde os trópicos até as zonas temperadas, atingindo os cinco continentes. Esta ampla difusão deve-se ao seu valor nutritivo, conferido pelo conteúdo protéico (VIEIRA & HEMP, 1992), carboidratos e ferro (BORÉM & CARNEIRO, 2006). No Brasil representa a fonte de proteína vegetal mais significativa da alimentação do brasileiro (RODRIGUES et al., 1999).

Embora no Brasil essa espécie seja exótica, com prováveis centros de origem da América Central e região Andina da América do Sul (ZIMMERMANN & TEIXEIRA, 1988¹ *apud* VIEIRA & HEMP, 1992), ela se encontra amplamente adaptada as condições de clima e solo brasileiros (BORÉM & PETERNELLI, 1997).

Taxonomicamente, o feijoeiro é do gênero *Phaseolus*, que inclui aproximadamente 100 espécies, das quais apenas quatro são cultivadas: *P. vulgaris* L. (feijão comum), *P. coccineus* L. (feijão ayocote), *P. acutifolius* F. (feijão tepari) e *P. lunatus* L. (feijão de lima). O feijão comum é a principal espécie deste gênero. É uma planta anual herbácea e termófila, isto é, não suporta geada. Seu cultivo visa principalmente a produção de grãos (VIEIRA & HEMP, 1992).

A produção nacional total de feijão em grãos para a safra em 2007 foi reduzida em 2,8% de área plantada (3.907.467 ha), 3,1% da produção (3.330,435 t) e 0,5% da produtividade (852 kg/ha) (IBGE, 2007). Além das condições climáticas, problemas fitossanitários da cultura são responsáveis pela queda da produção agrícola de feijão no Brasil (BORÉM & CARNEIRO, 2006).

2.2 DOENÇAS DO FEIJOEIRO

O feijoeiro é afetado por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias,

¹ZIMMERMANN, M.J.O.; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro; fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato, p.79-85, 1988.

fungos e nematóides, as quais contribuem para o seu baixo rendimento, em todas as regiões do mundo onde é praticada (SARTORATO et al., 1996).

Muitas doenças podem causar, dependendo das condições do ambiente, danos totais na produção ou, então, dependendo do nível de contaminação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (PAULA JUNIOR & ZAMBOLIM, 1998).

2.2.1 Mancha angular - *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun

A mancha angular do feijoeiro, causada pelo fungo *P. griseola*, ocorre na maioria das regiões produtoras de feijão do Brasil. Essa doença é atualmente um dos principais problemas para a cultura do feijão em áreas irrigadas (VALE et al., 1997). As perdas variam de 7,9 a 11,5%, dependendo da resistência do cultivar (SARTORATO & RAVA, 1992). No Paraná, a mancha angular vem merecendo atenção, principalmente em regiões agrícolas que fazem o plantio consecutivo de variedades suscetíveis (CARNEIRO et al., 1997).

2.2.1.1 Sintomas

Os sintomas da doença manifestam-se no caule, folhas e vagens. Nas folhas primárias, as lesões são geralmente circulares, de cor castanha ou marrom-avermelhada. Nas folhas trifoliadas formam-se lesões necróticas de coloração acinzentada e formato irregular. Posteriormente, estas adquirem coloração marrom-escura e formato angular, sendo delimitadas pelas nervuras. Com a ocorrência de grande número de lesões, estas coalescem, causando necrose das folhas e desfolha prematura. Em alguns casos, pode-se observar regiões cloróticas ao redor das lesões. Dependendo da idade da folha, a presença de um pequeno número de lesões necróticas já resulta em clorose e abscisão prematura da mesma (BIANCHINI et al., 2005).

Nos ramos e pecíolos as lesões são alongadas e escuras. Nas vagens, as manchas arredondadas e castanho-escuras, de tamanho variável, podem ser diferenciadas das lesões de antracnose por não serem deprimidas e não apresentarem o centro mais claro. Sementes podem ser infectadas principalmente

através do hilo. A infecção das sementes reduz a germinação e o desenvolvimento das plântulas. *P. griseola* produz sinemas e conidióforos escuros sobre as lesões após períodos de 24 a 48 horas de contínua umidade (SARTORATO et al., 1996).

2.2.1.2 Etiologia

P. griseola pertence ao grupo dos fungos mitospóricos e produz sinemas na face inferior da folha, com 250 µm de comprimento e 20-40 µm de largura, compostos por conidióforos paralelos e escuros, formando tufo visíveis a olho nu. Os conídios são de cor cinza, cilíndricos a fusiformes, às vezes curvos, com dois a seis septos, medindo 35-70 µm de comprimento e 5-7,5 µm de largura no centro e 1,5-2 µm de largura na base. *P. griseola* sobrevive em sementes e restos de cultura, sendo disseminado pelo vento, respingos de chuva e partículas de solo. A viabilidade do fungo na semente diminui com o tempo. Os conídios germinam em temperaturas entre 8 e 32 °C, com ótimo a 20-28 °C. O desenvolvimento da doença ocorre em temperaturas entre 16 e 28 °C, preferencialmente a 24 °C. O fungo penetra pelos estômatos e coloniza o hospedeiro. Os sintomas aparecem cerca de 8-12 dias após, quando então o estroma se desenvolve na cavidade sub-estomática. A esporulação ocorre durante períodos de alta umidade (BIANCHINI et al., 2005).

2.2.1.3 Controle

O controle da mancha angular pode ser feito através do uso de sementes saudáveis, eliminação dos restos culturais infectados, rotação de culturas, controle químico ou variedades com bom nível de resistência (VALE et al., 1997).

2.3 CONTROLE DE DOENÇAS

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir alta produtividade e qualidade de produção (KIMATI, 1995). No entanto, o uso indiscriminado de tais produtos pode

acarretar, em longo prazo, o surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, além do ressurgimento de pragas e efeitos negativos para a sociedade e ao meio ambiente (GHINI & KIMATI, 2000).

Aproximadamente meio milhão de toneladas de pesticidas e herbicidas são produzidas anualmente para aplicação em culturas, apenas nos Estados Unidos. Desse total, estimou-se que apenas 1% aproximadamente de fato alcança o organismo alvo. A maior parte do restante pode chegar ao solo, à água ou a organismos que não se deseja atingir no ecossistema. Assim, buscam-se métodos menos danosos para melhorar os rendimentos agrícolas (RAVEN et al., 2001) e/ou alternativas de controle de fitopatógenos que minimizem os impactos ambientais e mantenham a alta produtividade agrícola. Neste contexto, a própria natureza vem sendo investigada como fonte de soluções em potencial (SAITO & LUCHINI, 1998).

2.3.1 Controle alternativo de doenças

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças de plantas, no qual se incluem o controle biológico e a indução de resistência (MORAES, 1992).

No controle biológico a ação se dá sobre o patógeno, enquanto que na resistência induzida a ação é sobre a planta hospedeira, modificando a sua relação com a praga ou o patógeno. A prática de controle alternativo quer de pragas ou de doenças de plantas, não faz uso de defensivos agrícolas, embora possam estar associadas, de maneira integrada aos métodos tradicionais de controle químico e/ou práticas culturais a fim de aumentar a sua eficiência (MORAES, 1992).

2.3.1.1 Indução de resistência

As plantas não aceitam passivamente o ataque de patógenos e visam conter essa agressão com barreiras existentes antes do ataque. Estas barreiras são denominadas de defesa constitutiva e são representadas por estruturas como as ceras, cutícula, parede celular espessa, tricoma e fibras vasculares, bem como substâncias químicas pré-formadas, como os fenóis, alcalóides, lactonas

insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (RESENDE & MACHADO, 2000; PASCHOLATI & LEITE, 1995; CAVALCANTI et al., 2005a). Entretanto, há mecanismos de defesa produzidos ou ativados somente na presença do patógeno (ativos ou induzíveis). Estes mecanismos envolvem a formação de estruturas como papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, tiloses e deposição de goma, além de compostos como fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) (RESENDE & MACHADO, 2000; PASCHOLATI & LEITE, 1995; CAVALCANTI et al., 2005a; TAIZ & ZEIGER, 2006).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997). As plantas ativam um conjunto de respostas de resistência após o reconhecimento de um patógeno ou pela aplicação exógena de indutores de resistência (GUZZO et al., 1999).

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 a distância do local onde foi aplicado o agente indutor (MORAES, 1992).

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações bioquímicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves, como a peroxidase (FRIC, 1976), polifenoloxidasas (PASCHOLATI & LEITE, 1995) e β -1,3-glucanases (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993), além de alterações fisiológicas como a síntese de proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) (AGRIOS, 2005) e clorofila (STANGARLIN & PASCHOLATI, 2000).

2.3.1.1.1 Alterações bioquímicas da indução de resistência

2.3.1.1.1.1 Peroxidase

A enzima peroxidase (E.C. 1.11.1.7) 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). São classificadas como proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP), pertencentes a família PR-9 (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999).

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).

2.3.1.1.1.2 Polifenoloxidase

Polifenoloxidases agrupa um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis originando quinonas altamente tóxicas aos microrganismos (PASCHOLATI & LEITE, 1995) e a insetos. Neste último, taninos na forma fenólica são oxidados a quinonas apresentando alta reatividade com as proteínas na dieta do inseto, impedindo que este possa digerir-las (TAIZ & ZEIGER, 2006).

As polifenoloxidases geralmente se mantêm na forma inativa no interior da célula vegetal, compartimentalizada nos tilacóides dos cloroplastos, sendo liberadas e iniciando a oxidação dos compostos fenólicos somente quando a planta hospedeira sofre o ataque de insetos ou patógenos (MOHAMMADI & KAZEMI, 2002).

2.3.1.1.1.3 β -1,3-Glucanases

As enzimas β -1,3-glucanases pertencem à família PR-2 e são agrupadas em três classes distintas, baseando-se nas seqüências de aminoácidos de suas

estruturas primárias. As glucanases de classe I são proteínas básicas e estão localizadas no vacúolo da célula vegetal, especialmente na epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas saudáveis, enquanto que as classes II e III incluem as proteínas ácidas extracelulares (SELITRENNIKOFF, 2001² *apud* GUZZO, 2003).

As β -1,3-glucanases hidrolizam polímeros de β -1,3-glucana, composto que juntamente com a quitina são os principais componentes da parede celular fúngica (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993).

Na indução de resistência, o incremento da β -1,3-glucanase está relacionada com a defesa da planta. Kuhn (2007) verificou aumento significativo da enzima quando as plantas de feijão receberam tratamento com Acibenzolar-S-metil (indutor de resistência comercial), e Stangarlin & Pascholati (2000) observaram aumento na produção de β -1,3-glucanase em plantas de feijão (cv. Carioca) quando infectadas com *Uromyces appendiculatus*.

2.3.1.1.2 Alterações fisiológicas da indução de resistência

2.3.1.1.2.1 Proteínas

O conteúdo de proteínas no tecido vegetal desafiado com um patógeno ou tratado com eliciador indica a ativação dos mecanismos de defesa. É de suma importância a verificação das enzimas chaves na indução de resistência, porém deve-se considerar que aspectos fisiológicos também são alterados e a sinergia entre o metabolismo primário e secundário, assim como os compostos produzidos, agem de forma complexa na proteção da planta. Dessa forma, destaca-se a importância de estudos que demonstram o teor de proteínas solúveis nas plantas tratadas.

Entre as proteínas, há as relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), as quais são induzidas nos tecidos vegetais em função da inoculação com patógenos/microrganismos, sistemicamente ou em parte destes, bem como pelo tratamento com agentes químicos (GUZZO, 2003). A ativação da síntese protéica

²SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Appl. Environm. Microbiol.** 67:2883-94, 2001.

leva a uma fase de resistência da planta (LARCHER, 2000).

Kuhn (2007) verificou redução no teor de proteínas em plantas de feijão quando tratadas com *Bacillus cereus*, tendência contrária ao tratamento com acibenzolar-S-metil, demonstrando a especificidade na resposta fisiológica do hospedeiro ao tratamento.

2.3.1.1.2.2 Clorofila

A energia da luz solar é absorvida pelos pigmentos ativos no processo de fotossíntese, encontrados no cloroplasto (RICKLEFS, 2003). Entre esses pigmentos, as clorofilas *a* e *b* são as mais abundantes (TAIZ e ZEIGER, 2006). A clorofila *b* difere da *a* apenas pela substituição do grupo metila ligado ao anel II da porfirina desta última, pelo grupo formila (KERBAUY, 2004). Essas moléculas encontram-se em diferentes proporções nos fotossistemas, sendo que a clorofila *a* é mais abundante quando comparada a *b* (FERRI, 2004).

A energia gerada pelo processo de fotossíntese pode, em dado momento, estar voltado para a produção de compostos do metabolismo secundário, como por exemplo, no caso de ataque de patógenos (LARCHER, 2000).

Fungos hemibiotróficos como *P. griseola* podem implicar diretamente no grau das alterações do hospedeiro, quer seja em nível de fotossíntese, quer seja em nível de respostas de defesa frente à infecção (STANGARLIN et al. 2000).

2.3.1.2 Indutores de resistência

A indução de resistência local e sistêmica a doenças tem sido observada em várias plantas em resposta ao tratamento prévio do hospedeiro com diferentes agentes (KUC, 1995). Entre os agentes capazes de induzir resistência em plantas estão os bióticos, como microrganismos viáveis ou inativos, ou abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (HIJWEGWN et al., 1996) e acibenzolar-S-metil (ASM), além de metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005b). Moléculas de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar e/ou induzir qualquer

resposta de defesa nas plantas são chamadas de eliciadores (KUC, 1995; SMITH, 1996).

Entre os eliciadores não convencionais pode-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (compostos secundários) 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 (DI PIERO et al., 2005).

2.3.2 Potencial de cogumelos no controle de doenças

Ainda que a diversidade dos Basidiomicotas em ecossistemas tropicais seja vasta (HAWKSWORTH, 1991), no Brasil existem poucas pesquisas relacionadas com a utilização de cogumelos ou orelhas de pau para o controle de doenças em plantas, demonstrando a escassez de estudos relacionados ao potencial dos mesmos para ativação de mecanismos de defesas em vegetais (FIORI-TUTIDA, 2003). 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., 1995, 1997).

Di Piero & Pascholati (2004) demonstraram redução parcial na severidade da antracnose em folhas de pepino pré-tratadas com extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, bem como sistemicamente. O efeito protetor foi dependente da concentração do extrato de cogumelo utilizado e, em menor grau, do intervalo de tempo entre indução-inoculação e o ambiente.

Fiori-Tutida (2003) verificou através dos extratos brutos dos cogumelos *L. edodes* e *A. blazei*, potencial como eliciadores de respostas de defesa em plântulas, uma vez que estimulou a produção de fitoalexinas em soja e em sorgo, indução de proteínas-RP (β -1,3-glucanase e peroxidase) em trigo e ativaram rotas metabólicas para a formação de papilas em mesocótilos de sorgo.

2.3.2.1 *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). É um fungo saprofito de crescimento lento comumente conhecido como orelha de pau e faz parte da Divisão Basidiomycota e família Polyporaceae (MARQUES, 2001) (Figura 1).



Figura 1 Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Fonte: o autor.

Esta espécie é utilizada como medicamento por indígenas na América Latina (PÉREZ-SILVA et al., 1988). Em comunidades de Santa Catarina, o seu uso é recomendado, na medicina popular, para tratamento de feridas supurativas (SMÂNIA et al., 1995, 1997).

Smânia et al. (1995) verificaram que estirpes de *P. sanguineus* apresentam atividade antimicrobiana contra 11 espécies de bactérias associadas a fontes alimentares como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e gênero *Streptococcus*.

Watanabe et al. (2005) concluíram que *P. sanguineus* é bom produtor da enzima lacase e, conseqüentemente, são capazes de tratar o efluente da indústria farmacêutica. Para Silva et al. (2003), a presença de ligninase, Mn-peroxidase e β -glucosidase na cepa amazônica de *P. sanguineus* indica-o como potencial para uso industrial, especialmente em tratamento de efluentes de indústria papelreira.

Os efeitos medicinais relatados pelo uso de *P. sanguineus* são devidos à síntese de uma variedade de metabólitos e entre estes, pigmentos vermelho-alaranjados característicos do tipo 2-amino fenoxazina e esteróis. Entre os diversos pigmentos isolados e identificados, cinabarina, o ácido cinabarínico e a tramesanguina são os mais abundantes, enquanto entre os esteróis, o ergosterol e o 5,6-dihidroergosterol são os majoritários. A cinabarina é mais ativa contra bactérias Gram-positiva do que contra Gram-negativa tanto de origem alimentar quanto de origem humana (MARQUES, 2001).

P. sanguineus apresenta potencial biotecnológico para a biorremediação do solo, produção de enzimas de interesse para a agricultura, indústria de alimentação, fabricação de detergentes, fungicidas, inseticidas (SILVA et al., 2003) e no controle alternativo de doenças em plantas (ASSI, 2005; BENINCA, 2007).

Assi (2005) verificou que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* controlaram a antracnose causada por *C. lindemuthianum* em feijoeiro, o que pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana, através da inibição da germinação de conídios, quanto por indução de resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases.

Beninca (2007) verificou que os extratos orgânicos diclorometânico, hexânico e etanólico de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* não possuem atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja, mas induzem a síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE *P. griseola*

O isolamento de *P. griseola* foi obtido a partir de lesões de plantas de feijoeiro infectadas naturalmente com a doença, coletadas no município de Cascavel. O fungo *P. griseola* foi cultivado de acordo com a metodologia adotada por Stangarlin et al. (2000), em meio de suco de tomate (200 mL de suco de tomate integral + 15 g de ágar + 4,5 g de CaCO₃ + 800 mL de água destilada), por 14 dias.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE BASIDIOCARPOS DE *P. sanguineus*

A obtenção do extrato aquoso foi adaptada das metodologias de Assi (2005) e Di Piero et al. (2006). Basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados nas matas da região Oeste do Paraná, identificados de acordo com chave taxonômica para fungos (PEGLER, 1973) e, posteriormente, secos em temperatura constante de 30 °C e moídos em moinho de esfera. O preparo dos extratos aquosos constituiu na hidratação do pó seco de basidiocarpos por 24 h a temperatura de 4 °C, na proporção de 14 mL água destilada para 1 g de pó seco de basidiocarpo, sendo em seguida filtrados em papel de filtro Whatman nº 1, obtendo dessa forma o extrato bruto de basidiocarpo, do qual realizaram-se as diluições com água.

3.3 OBTENÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE *P. sanguineus*

Micélio de *P. sanguineus* foi cultivado em meio de cultura sólido (BDA) e posteriormente repicados para meio líquido (BD), contendo 20 g dextrose em 1000 mL de água destilada.

Utilizaram-se frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BD, autoclavado a 120 °C e 1 atm por 20 min. Cada frasco recebeu três discos (5 mm cada) de meio de cultura sólido, contendo micélio do fungo isolado, obtidos de

colônias de 14 dias de idade. Após a repicagem os frascos foram mantidos em agitação (150 rpm) sob temperatura de ± 26 °C e luz ambiente (laboratório) por 30 dias de incubação. Após esse período, as colônias foram filtradas separadamente e assepticamente em papel Whatman nº 41, obtendo-se dessa forma, o filtrado bruto da cultura e micélio do fungo. O filtrado obtido foi mantido em geladeira a 4 °C. O micélio obtido foi seco em estufa a 45 °C até peso constante e em seguida moído em moinho de esfera. A hidratação desse pó de micélio foi da mesma forma que a realizada para o pó de basidiocarpos (descrito no item 3.2).

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*

3.4.1 Inibição de crescimento micelial

Os extratos de *P. sanguineus* foram incorporados nas concentrações de 0, 1, 5, 10, 15 e 20%, em meio de cultura de suco de tomate. Os extratos foram esterilizados em autoclave e também por filtração em membrana Millipore (0,45 µm de diâmetro de poro). Utilizaram-se como tratamentos controles o fungicida (azoxystrobin: 40 mg i.a. L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L⁻¹).

Para a repicagem de *P. griseola* nas placas de petri contendo os tratamentos, uma alíquota de 100 µL de suspensão de esporo de uma cultura com 14 dias de idade foi adicionada nas placas e homogeneizado com alça de Drigalski. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 24 °C com escotofase total.

As avaliações realizaram-se por meio de medições do diâmetro e número de colônias 14 dias após a instalação do experimento.

3.4.2 Inibição de esporulação

Ao término do teste de inibição do crescimento micelial, avaliou-se a esporulação de cada uma destas placas. Para isto, preparou-se uma suspensão de esporos através da adição de 10 mL de água destilada por placa, raspagem da

colônia e filtragem em gaze, sendo determinado o número de esporos por mL em câmara de Neubauer ao microscópio óptico. De acordo com a metodologia adaptada de Assi (2005).

3.4.3 Inibição de germinação de esporos

O teste de inibição de germinação de esporo na presença dos extratos foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1 % (700 µL por lâmina).

Alíquotas de 40 µL das concentrações dos extratos aquosos esterilizados em autoclave ou filtrados em membrana Millipore (0,45 µm de diâmetro de poro), corrigidas para se manter os mesmos valores indicados em 3.4.1 e alíquotas de 40 µL da suspensão de esporos de *P. griseola* (1×10^4 conídios mL⁻¹) obtidos de uma cultura com 14 dias de idade, foram distribuídos na superfície das lâminas. As quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24 °C. Como controle negativo utilizou-se água destilada esterilizada e os controles positivos com presença de fungicida (azoxystrobin: 40 mg i.a. L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L⁻¹).

A porcentagem de germinação foi determinada 24 horas após a instalação do experimento com a adição de uma alíquota de 40 µL de Lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação de esporos (DI PIERO & PASCHOLATI, 2002). O esporo foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

A avaliação do experimento 24 horas após a instalação do mesmo foi baseada no resultado da curva de germinação de esporos, realizada previamente, na qual obteve-se o tempo necessário para máxima porcentagem de germinação.

Para tanto, uma alíquota de 80 µL de suspensão de esporos (1×10^4 conídios mL⁻¹) foi adicionada sobre uma lâmina de microscopia revestida com fina camada de ágar-água 1% (700 µL por lâmina). A paralisação da germinação foi feita através do emprego de 40 µL de lactofenol azul de algodão a cada 4 h em três repetições, até 40 h. Ao final realizou-se a observação ao microscópio óptico.

3.5 MATERIAL VEGETAL

3.5.1 Cultivo em casa de vegetação

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S.

As plantas de feijoeiro (IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos (capacidade para 3 L) contendo uma mistura de solo e areia esterilizados (proporção 2:1). Não realizou-se adubação devido a análise de solo apresentar resultados satisfatórios de nutrientes.

3.5.1.1 Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação

Para o teste de indução de resistência, utilizaram-se os tratamentos com extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* (como descritos nos itens 3.2 e 3.3), nas concentrações 10 e 20%, além de um controle negativo: plantas tratadas com água destilada, e dois controles positivos: fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L⁻¹).

Os tratamentos foram aplicados na fase vegetativa (V4), quando a 4ª folha trifoliolada do feijoeiro atingiu 50% de área foliar e três dias antes da inoculação do patógeno. Os extratos, em quantidades de 3 mL, foram aplicados na 3ª folha. A inoculação dos esporos do patógeno realizou-se na 3ª folha, bem como na 4ª folha não tratada, para se observar a ocorrência de proteção local e/ou sistêmica, respectivamente.

A suspensão de esporos do fungo *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota/500 mL), sendo a concentração ajustada para 4x10⁴ conídios mL⁻¹. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara-úmida e no escuro a temperatura ambiente por 48 h e, posteriormente, mantidas em casa de vegetação, segundo metodologia utilizada por Stangarlin et al. (2000).

3.5.2 Cultivo a campo

O cultivo a campo foi conduzido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S. As plantas de feijoeiro (IAPAR 81 – Carioca) foram semeadas em novembro de 2006.

O experimento constituiu-se de três blocos casualizados, sendo que cada bloco era composto por nove parcelas, e cada parcela dentro de um bloco representava um tratamento. Cada tratamento foi constituído de três linhas de 3 m de comprimento, espaçadas 0,5 m entre si, com dez plantas viáveis por metro linear. A linha central, descontando-se 0,5 m da bordadura anterior e posterior, foi considerada área útil para avaliação.

Foram aplicados 400 kg ha⁻¹ de NPK (04-14-08) no sulco da semeadura (de acordo com análise de solo) e os demais tratos culturais como capinas foram realizados sempre que necessário.

3.5.2.1 Aplicação dos tratamentos a campo

Para o teste de indução de resistência a campo, utilizaram-se os tratamentos com extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* (como descritos nos itens 3.2 e 3.3), nas concentrações 10 e 20%, além de um controle negativo: plantas tratadas com água destilada, e dois controles positivos: fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L⁻¹).

Realizaram-se duas aplicações dos extratos: a primeira na fase vegetativa (V3) (05/12/2006) e a segunda na fase reprodutiva (R3) (26/12/2006), ambas três dias antes da inoculação do patógeno.

Os extratos foram aplicados por aspersão em toda a planta (5 mL de solução por planta). A inoculação realizou-se por aspersão da suspensão de esporos de *P. griseola*, preparada em água com Tween 20 (uma gota/500 mL), sendo a concentração ajustada para 4x10⁴ conídios mL⁻¹.

3.5.3 Avaliação de severidade

A severidade da doença em casa de vegetação foi avaliada nas 3ª e 4ª folhas no 8º, 12º, 16º, 20º e 24º dias após a inoculação, com escala diagramática elaborada por Godoy et al. (1997).

A campo as avaliações iniciaram quando surgiu o primeiro sintoma da doença (sete dias após a inoculação), e obtendo-se cinco avaliações a cada quatro dias da porção mediana inferior das plantas. Na segunda aplicação dos tratamentos, a severidade foi avaliada da mesma forma que na primeira aplicação, porém avaliando-se a porção mediana superior do feijoeiro.

Com as avaliações de severidade da doença, procedeu-se a construção da curva de progresso da doença e a determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por meio da equação proposta por Campbell & Madden (1990):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \right]$$

n = número de avaliações;

y = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t = tempo no momento da i-ésima.

3.6 COLETA DE AMOSTRA PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Discos de folha com 3,46 cm² (três discos/amostra) foram coletados 48, 72, 96 e 120h após a inoculação e também após o aparecimento dos sintomas. Durante o procedimento, cada amostra coletada foi imediatamente acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a -20 °C. Coletaram-se amostras nas 3^{as} folhas trifoliadas inoculadas, bem como as 4^{as} folhas trifoliadas não-inoculadas (STANGARLIN & PASCHOLATI, 2000).

3.6.1 Obtenção dos extratos protéicos

As amostras de folhas foram homogeneizadas mecanicamente em 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0) (tampão de extração), em almofariz de porcelana. O homogenato foi centrifugado a 6.500 g durante 10 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático, para posterior determinação da atividade de peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3-glucanase e conteúdo protéico.

3.6.2 Atividade de peroxidase

A atividade de peroxidases foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto a 470 nm durante 2,15 min (LUSSO & PASCHOLATI, 1999). A mistura da reação continha 0,10 mL de extrato protéico (conforme 3.6.1) e 2,9 mL de solução com 12,5 mL de guaiacol a 2% e 360 μ L de peróxido de hidrogênio em 87,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 12,5 mL de guaiacol a 2% e 360 μ L de peróxido de hidrogênio em 87,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa em absorvância $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso fresco.

3.6.3 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação ocorreu misturando-se 950 μ L do substrato e 50 μ L do extrato enzimático (item 3.6.1). A atividade foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto a 420 nm durante 2,15 min. Os resultados foram expressos em absorvância $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso fresco.

3.6.4 Atividade de β -1,3-glucanase

A atividade da β -1,3-glucanase foi avaliada segundo metodologia descrita por Stangarlin et al. (2000). A reação foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada da laminarina, através do uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (HAPHB). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 1 h continha 100 μ L do extrato enzimático (conforme 3.6.1) 150 μ L de laminarina (2 mg/mL) e 50 μ L de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). Após esse período, retirou-se 30 μ L e transferiu-se para um novo tubo, acrescentando sobre este 1,5 mL de uma solução de HAPHB (0,5 g dissolvidos em 20 mL de HCl 0,5 M, acrescido de 80 mL de NaOH 0,5 M), sendo em seguida essa mistura aquecida a 100 °C por 10 min. Após resfriamento em gelo das amostras, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 410 nm. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose e os resultados expressos em μ g de glicose $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso fresco, descontando-se os valores de absorbância do controle (100 μ L do extrato enzimático + 50 μ L de tampão fosfato de 0,01 M (pH 6,0) + 1,5 de HAPHB, a laminarina é adicionada após a incubação a 40 °C por 1 h).

3.6.5 Teor de proteína

O teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de Bradford (1976). A mistura da reação foi constituída de três réplicas, sendo que para cada réplica foi utilizado 15 μ L do extrato enzimático (item 3.6.1), 775 μ L de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 200 μ L do reagente de Bradford, o qual foi adicionado sob agitação. Após 5 min realizou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas, expressa em termos equivalentes de μ g de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (μ g proteína mL^{-1}), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20 μ g mL^{-1} .

3.6.6 Teor de clorofila

Para a quantificação da clorofila foi utilizada a metodologia adaptada de Arnon (1949). As amostras de tecido vegetal (0,100 g) foram acondicionadas em frascos de vidro com 10 mL de acetona 80%, durante 7 dias. Após esse período realizou-se leitura no espectrofotômetro a 663 nm e 645nm para clorofila *a* e *b*, respectivamente. A concentração de clorofila *a* obteve-se pela fórmula $(0,0127.A_{663}) - (0,00269.A_{645})$ e para clorofila *b* $(0,0229.A_{645}) - (0,00468.A_{663})$. O teor de clorofila total foi obtido pela soma dos resultados. Os valores foram expressos em mg g⁻¹ peso fresco.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental *in vitro* foi inteiramente casualizado (DIC), organizado em esquema fatorial 3 x 6 + 2 (três tipos de extratos: basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura, seis concentrações: 0, 1, 5, 10, 15 e 20% e dois controles: fungicida e ASM) com cinco repetições por tratamento.

As análises bioquímicas foram organizadas em esquema fatorial 3 x 2 + 3 (três tipos de extratos, duas concentrações e três controles). Cada tratamento apresentava três repetições, sendo que cada repetição foi representada por três discos de tecido vegetal.

A severidade em casa de vegetação e a campo apresentou-se em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 2 + 3 (três tipos de extratos, duas concentrações e três controles). Sendo que em casa de vegetação havia 10 plantas por tratamento e a campo 30 plantas.

A análise de variância foi realizada através do programa estatístico JMP (Statistical Analysis System SAS Institute Inc. EUA, 1989 – 2000 versão 4.0.0.), e a comparação das médias dos tratamentos com os controles foi realizada com a aplicação do teste de Dunnett's em nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*

4.1.1 Inibição do crescimento micelial

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de *P. sanguineus* sobre o crescimento micelial de *P. griseola* foi significativa apenas para o extrato obtido do micélio e esterilizado por filtração em membrana Millipore (Figura 3), não apresentando diferença estatística para os extratos de basidiocarpo e filtrado de cultura (dados não mostrados). Esse extrato promoveu redução do crescimento micelial em 100% na maior concentração (20%) quando comparada ao controle água, não diferindo estatisticamente do fungicida, e as concentrações 5, 10 e 15 % foram tão fungitóxicas quanto o ASM (Figura 2).

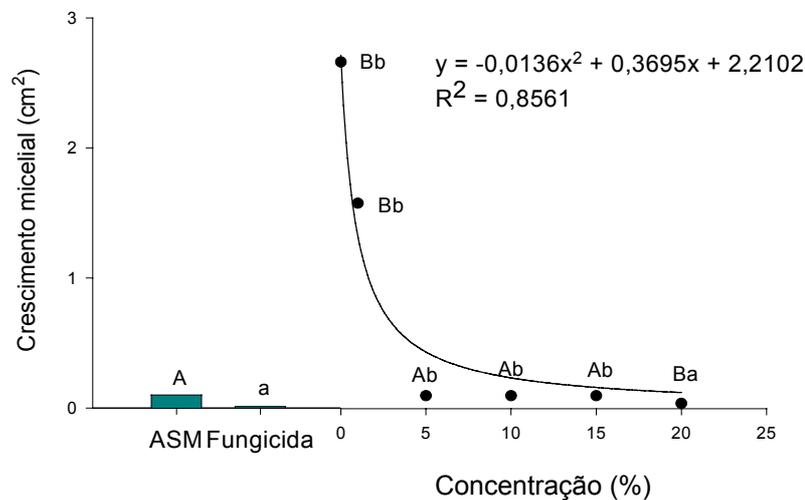


Figura 2. Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Pseudocercospora griseola* em função do tratamento com extrato aquoso de micélio de *Pycnoporus sanguineus*, esterilizado por filtração em membrana Millipore. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com Fungicida) não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett's a 5% de probabilidade. ASM: acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L⁻¹). Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

Esse resultado indica a presença de compostos termoláveis no micélio de *P. sanguineus*, onde o extrato autoclavado não apresentou efeito sobre a variável avaliada.

Estudos realizados por Anke (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.

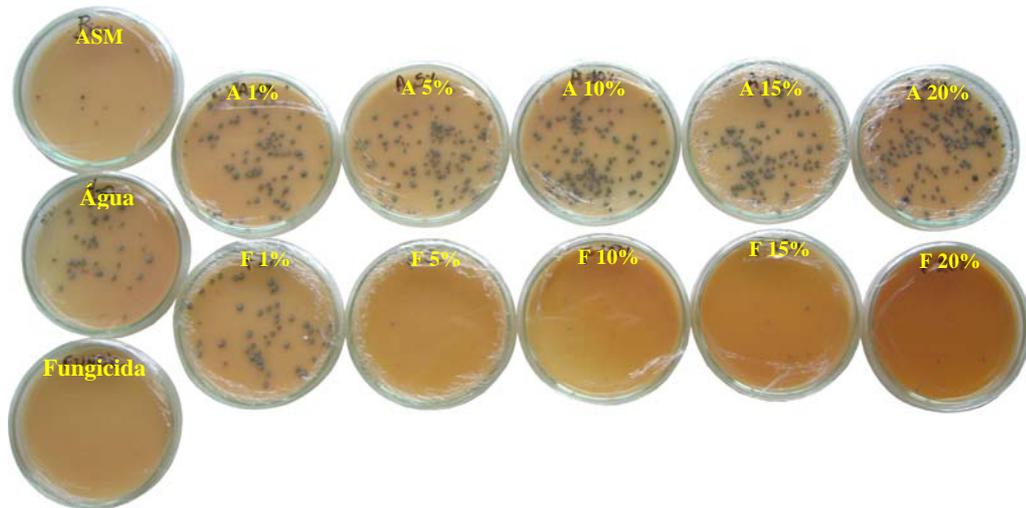


Figura 3 Efeito dos extratos de micélio de *P. sanguineus* sobre o crescimento micelial *in vitro* de *P. griseola*. (A) autoclavado e (F) filtrado em membrana Millipore.

4.1.2 Inibição da esporulação

O extrato aquoso obtido de micélio de *P. sanguineus* esterilizado por filtração, apresentou redução significativa na esporulação de *P. griseola*, o qual foi reduzido em 100% a partir da concentração 5% (Figura 4), não se verificando efeito com o mesmo extrato autoclavado, assim como os extratos obtidos de basidiocarpo e filtrado de cultura (dados não mostrados).

A esporulação é um importante mecanismo de perpetuação e disseminação do patógeno, assim produtos que reduzem a esporulação minimizam a quantidade de inóculo inicial e, conseqüentemente, a infecção. A eficiência de produtos naturais, como extratos de plantas com atividade *in vitro* sobre a esporulação são relatadas por Franzener et al. (2003) utilizando cânfora (*Artemisia camphorata*) sobre *Bipolaris sorokiniana*, inibindo completamente a esporulação a partir do extrato a 10%.

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, atraindo a atenção de pesquisadores nos últimos anos (WASSER, 2002).

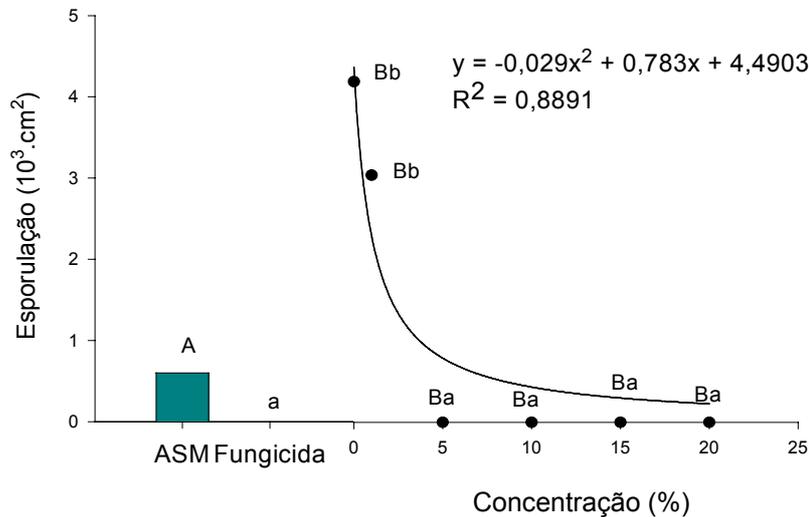


Figura 4 Inibição *in vitro* da esporulação de *Pseudocercospora griseola* em função do tratamento com extrato aquoso de micélio de *Pycnoporus sanguineus*, esterilizado por filtração em membrana Millipore. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com Fungicida) não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett's a 5% de probabilidade. ASM: acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L⁻¹). Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

4.1.3 Inibição da germinação de esporos

Os extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus* autoclavados e basidiocarpo e filtrado de cultura esterilizados por filtração não apresentaram efeito sobre a germinação de esporos de *P. griseola* (dados não mostrados). Ao passo que, o extrato obtido do micélio esterilizado por filtração inibiu a germinação de esporos de acordo com a concentração utilizada, (Figura 5).

Dados semelhantes são descritos por Assi (2005) com inibições de até 96% na germinação de *C. lindemuthianum* utilizando extratos aquosos de *P. sanguineus*.

O ativador químico ASM apresentou atividade fungitóxica *in vitro*, inibindo o crescimento micelial e esporulação de *P. griseola*, não apresentando atividade sobre a germinação de esporos, contrariando os resultados relatados por Jesus Jr et al.

(1999), o qual destaca que o ASM não apresentou atividade de inibição *in vitro* sobre *Phaeoisariopsis griseola*.

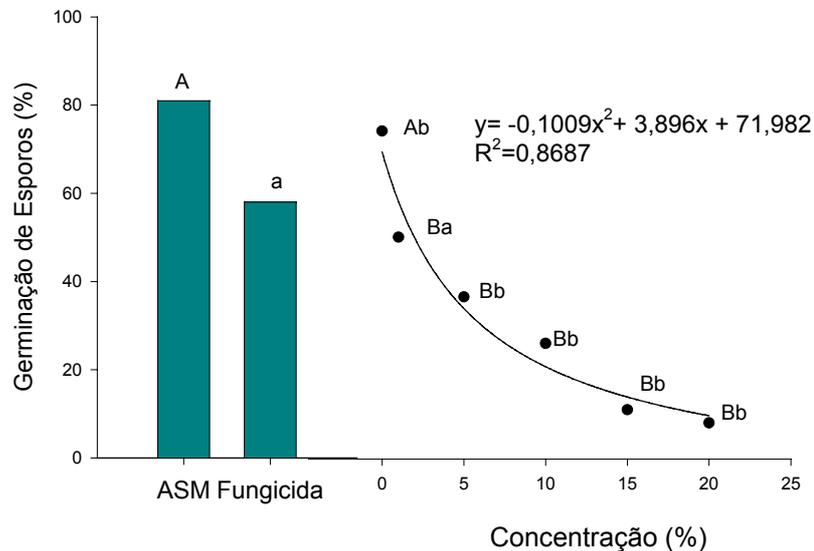


Figura 5 Inibição *in vitro* da germinação de esporos de *Pseudocercospora griseola* em função do tratamento com extrato aquoso de micélio de *Pycnoporus sanguineus*, esterilizado por filtração em membrana Millipore. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para comparação com ASM e minúscula para comparação com Fungicida) não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett's a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x + 0,5}$. ASM: acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L⁻¹). Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

4.2 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE EM CASA DE VEGETAÇÃO

A severidade em casa de vegetação apresentou-se baixa, provavelmente devido às condições climáticas no período de inoculação, o qual não foi favorável ao desenvolvimento do patógeno.

De acordo com a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) obtida para a 3ª folha trifoliolada tratada, bem como para a 4ª folha trifoliolada não tratada (Tabela 1), observa-se uma redução significativa na 3ª folha, em todos os tratamentos quando comparados ao controle água, com reduções de até 82,4 % da AACPD no filtrado de cultura a 10%. O basidiocarpo (10 e 20%) não proporcionou o mesmo controle que o fungicida, ao passo que o filtrado de cultura (10 e 20%) e o micélio (10 e 20%) não diferiram do mesmo. Os extratos de basidiocarpo (10 e 20%),

filtrado e micélio (20%) foram superiores ao ASM, enquanto filtrado e micélio a 10% não diferiram do mesmo.

A 4ª folha não tratada e apenas inoculada, apresentou baixa severidade, que além do efeito sistêmico do extrato de *P. sanguineus*, pode estar relacionada à idade da folha, a qual apresentava 50% de área foliar no momento da inoculação. Nesta fase de crescimento a atividade fisiológica é alta, favorecendo a agilidade da resposta bioquímica. Dessa forma, verificou-se diferença estatística dos extratos (exceto basidiocarpo a 10%) com redução da AACPD quando comparados com a água. Os tratamentos apresentaram efeito semelhante ao fungicida e ao ASM.

Tabela 1 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus*, na terceira folha tratada e na quarta folha apenas inoculada, em condições de casa de vegetação.

Tratamentos	AACPD	
	3ª FOLHA	4ª FOLHA
Basidiocarpo 10%	24,5 ^{1,2,3}	5,3
Basidiocarpo 20%	19,5 ^{1,2,3}	2,7 ¹
Filtrado de cultura 10%	7,4 ¹	2,5 ¹
Filtrado de cultura 20%	10,8 ^{1,2}	3,6 ¹
Micélio 10%	8,1 ¹	3,1 ¹
Micélio 20%	9,6 ^{1,2}	4,1 ¹
Água	41,9	8,8
ASM ¹	2,3	5,2
Fungicida ²	6,7	2,4
C.V (%)	31,4	7,3

Médias na coluna, seguida de letra indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). Para análise estatística os dados foram transformados por $\sqrt{x + 0,5}$;

¹ASM: acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L⁻¹);

²Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

4.3 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE A CAMPO

Através das avaliações de severidade a campo, obteve-se a AACPD, para a porção mediana inferior (1ª aplicação) e mediana superior (2ª aplicação) das plantas de feijoeiro (Tabela 2).

Na porção mediana inferior, verificou-se diferença estatística com AACPD superior em todos os tratamentos quando comparados ao fungicida, não diferindo da água e do ASM. Efeito contrário se verificou na mediana superior para a 2ª aplicação, onde todos os tratamentos apresentaram reduções significativas da AACPD quando comparados com a água, com reduções de até 63,8% para o tratamento basidiocarpo 20%. Os extratos obtidos de basidiocarpo (20%), filtrado de cultura (10 e 20%) e micélio (20%) reduziram a AACPD, apresentando resultados superiores ao indutor de resistência comercial (ASM). Quando comparados ao fungicida, todos os tratamentos diferiram do mesmo, apresentando maior severidade.

Observou-se um efeito aditivo no crescimento e coloração das plantas tratadas com o filtrado de cultura, com atraso, inclusive na senescência.

Assi (2005) obteve resultados semelhantes com extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus*, reduzindo a severidade da antracnose em feijoeiro de forma sistêmica.

Di Piero & Pascholati (2004) demonstraram redução parcial na severidade de antracnose em folhas de pepino pré-tratadas com os extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, de forma sistêmica. O efeito protetor foi dependente da concentração de cogumelo utilizada e, em menor grau, do intervalo de tempo entre a indução e a inoculação e o ambiente.

A utilização dos extratos de *P. sanguineus* no controle de doenças de plantas em cultivos orgânicos mostra-se promissora, já que apresentam níveis de controle semelhantes ao indutor de resistência comercial e com custo inferior aos fungicidas no cultivo convencional, além de não causar impactos ambientais, seja pela seleção de isolados fitopatogênicos resistentes ou por contaminação pelo uso dos produtos químicos.

Tabela 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro em função dos tratamentos com extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus*, em condições de campo.

Tratamentos	AACPD	
	Porção Mediana Inferior da planta	Porção Mediana Superior da planta
Basidiocarpo 10%	51,7 ³	54,2 ^{1,3}
Basidiocarpo 20%	49,9 ³	32,3 ^{1,2,3}
Filtrado de cultura 10%	48,0 ³	48,7 ^{1,2,3}
Filtrado de cultura 20%	48,4 ³	45,2 ^{1,2,3}
Micélio 10%	54,7 ³	68,0 ^{1,3}
Micélio 20%	48,6 ³	44,2 ^{1,2,3}
Água	59,4	89,0
ASM ¹	41,9	67,7
Fungicida ²	6,3	16,1
C.V (%)	47,5	53,9

Médias na coluna, seguida de letra indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). Para análise estatística os dados foram transformados por $\sqrt{x + 0,5}$;

¹ASM: acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L⁻¹);

²Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

4.4 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

4.4.1 Atividade de peroxidase

A atividade de peroxidase foi alterada em função dos tratamentos com basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando a sistemicidade do efeito em função dos extratos de *P. sanguineus* (Figura 6).

Na 3ª folha, o extrato basidiocarpo 10% reduziu a atividade da enzima quando comparado aos controles água e fungicida aos 3 dias após a inoculação (DAI). Aos 5 DAI diferiu do ASM e do fungicida e aos 7 dias do ASM. O basidiocarpo a 20% apresentou aumento da atividade de peroxidase aos 4 DAI, e inibição aos 3, 5 e 7 DAI, quando comparado aos controles ASM, ASM e fungicida e ASM, respectivamente.

O extrato aquoso de micélio a 10% reduziu a atividade de peroxidase aos 3, 5 e 7 DAI, quando comparados ao ASM e fungicida. Ao passo que o micélio 20% apresentou-se superior quando comparado ao ASM e fungicida (2 DAI), a água e ao fungicida (3 DAI), ao fungicida (4 DAI). Reduções comparadas com a água e ao ASM foram verificadas a partir dos 5 DAI.

Filtrado de cultura induziu a atividade aos 4 DAI, para o extrato 10%, comparado a água e fungicida, inibindo, posteriormente aos 5 e 7 DAI. O filtrado a 20% inibiu a síntese de peroxidase aos 5 e 7 DAI, em relação aos controles ASM e fungicida e ASM, respectivamente.

A 4ª folha não tratada apresentou os mesmos efeitos que a 3ª folha sobre a atividade da peroxidase, de forma mais ou menos acentuada.

Assi (2005) verificou ativação de peroxidase em feijoeiro tratadas com extrato aquoso de *P. sanguineus* e desafiadas com *C. lindemuthianum* tanto local como sistêmico, concordando com os resultados obtidos nesse trabalho.

Beninca (2007) avaliou o efeito de extratos orgânicos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, e verificou que o 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.

Para Kuhn (2007), a atividade de peroxidase em feijoeiro foi influenciada em função do tempo, do número de aplicações e do indutor. O indutor abiótico (ASM) promoveu aumento da atividade de forma mais acentuada e mais rápida que o indutor biótico (*Bacillus cereus*).

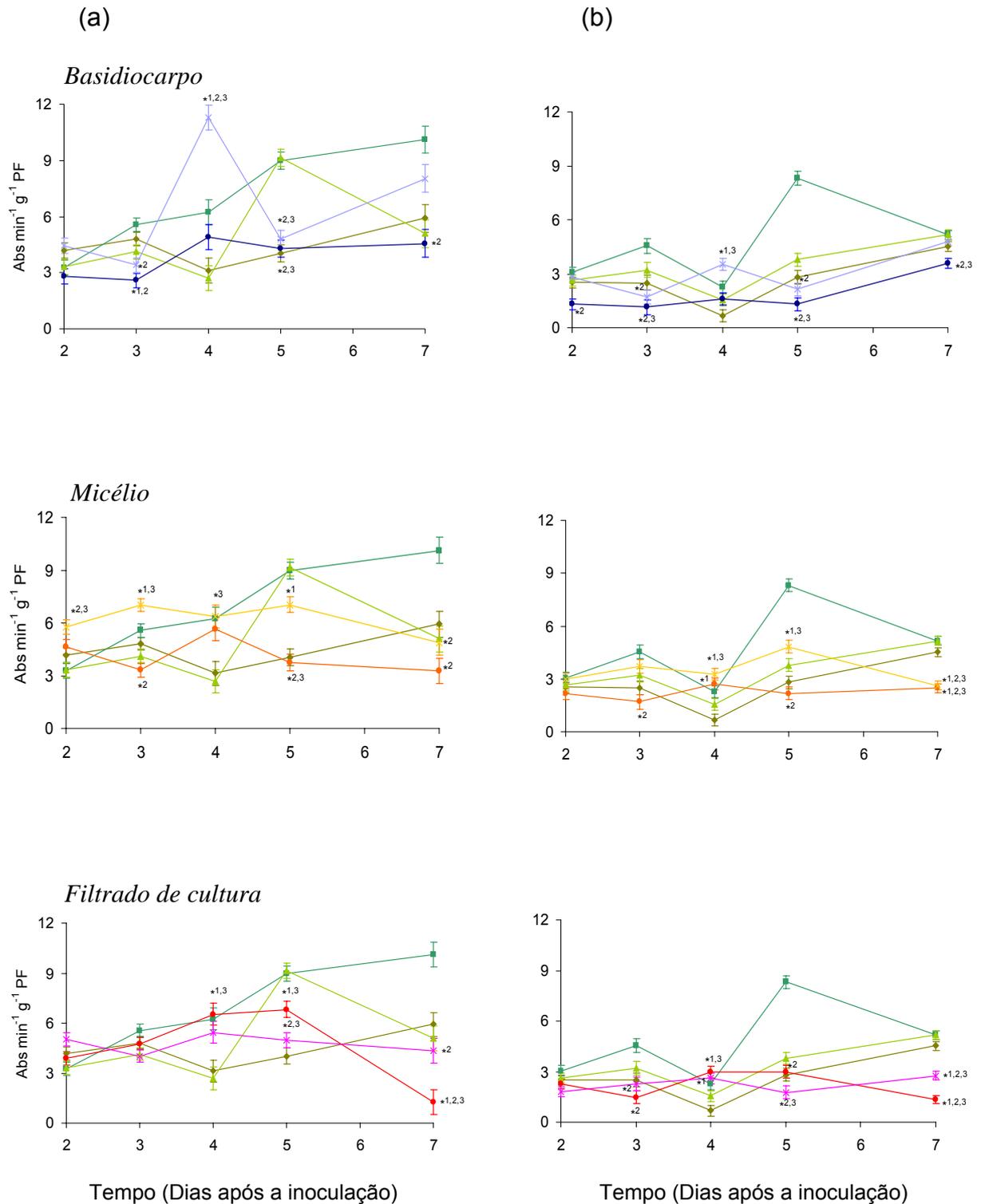


Figura 6 Atividade de peroxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após os tratamentos com os controles água (♦), Acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L⁻¹) (■) e Fungicida (Azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 10% e 20% (● e ×), Micélio 10% e 20% (○ e ×), Filtrado de cultura 10% e 20% (● e ×). (a) e (b) representam respectivamente a 3^o folha tratada e inoculada e a 4^o folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. *Seguido de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). PF: peso fresco.

4.4.2 Atividade de polifenoloxidase

A atividade da polifenoloxidase foi influenciada pelos tratamentos com extratos de *P. sanguineus*, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, demonstrando a sistemicidade do efeito (Figura 7).

Na folha tratada, o extrato de basidiocarpo a 10% reduziu a atividade da enzima quando comparado aos controles água e ASM aos 3 DAI. Aos 4 DAI estimulou quando comparado com a água e o fungicida e aos 5 DAI foi menor em relação ao ASM. O basidiocarpo a 20% apresentou aumento da atividade de polifenoloxidase em relação ao fungicida aos 3 DAI, aos 4 e 5 DAI, quando comparado aos três controles e aos 7 DAI em relação ao fungicida.

O extrato aquoso de micélio a 10% reduziu a atividade enzimática aos 3, 5 e 7 DAI, quando comparados ao ASM, ASM e fungicida e ASM respectivamente, porém, foi maior que a água e o fungicida aos 4 DAI. O micélio 20% apresentou-se superior quando comparado ao fungicida (3 DAI), a água e ao fungicida (4 e 5 DAI), apresentando redução em relação ao ASM, na presença do sintoma (7 DAI).

O extrato filtrado de cultura a 10% aumentou a atividade a partir do 3 DAI, em relação ao fungicida, aos 4 e 6 DAI comparado a água e fungicida e aos 7 DAI sofreu redução em relação a água e ASM.

A 4ª folha não tratada apresentou efeitos semelhantes a 3ª folha sobre a atividade da polifenoloxidase, exceto para o extrato de basidiocarpo a 10% que aos 7 DAI apresentou aumento significativo em relação aos controles.

A ativação de enzimas de defesa como a peroxidase e polifenoloxidase nas plantas de feijoeiro expostas aos extratos de *P. sanguineus*, caracterizam a indução de resistência e demonstram a eficiência de produtos naturais na ativação de respostas dos tecidos frente a tentativas de colonização pelo patógeno.

Romeiro (2007) ressalta a necessidade de investigar, com seriedade e persistência, métodos alternativos para o controle de enfermidades de plantas, que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente. Ativar os mecanismos de defesa da planta deixando que ela própria se proteja contra patógenos, em vez de saturá-la e intoxicá-la com defensivos, por certo será a estratégia politicamente correta do futuro.

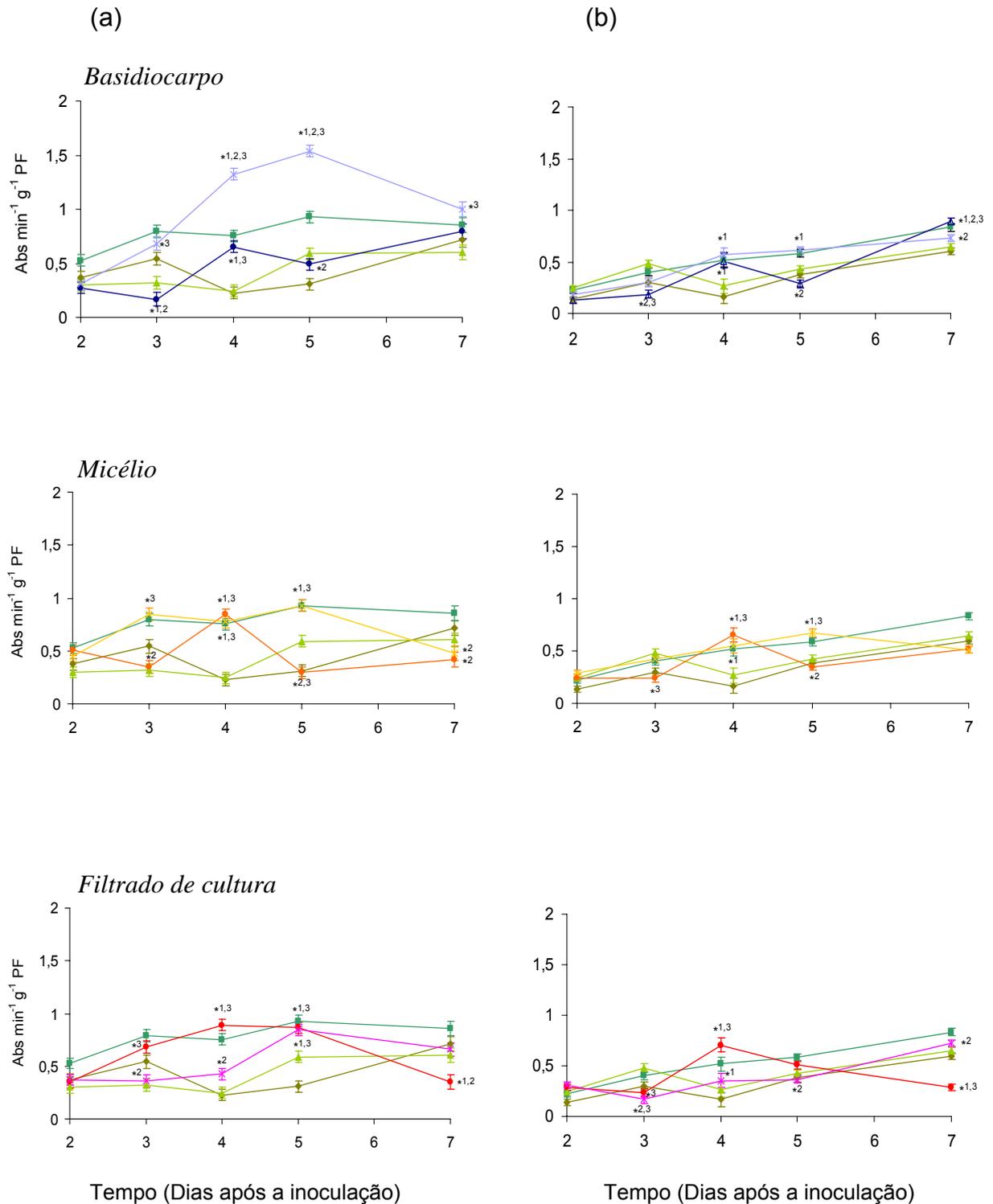


Figura 7 Atividade de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após os tratamentos com os controles água (♦), Acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L⁻¹) (■) e Fungicida (Azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 10% e 20% (● e ×), Micélio 10% e 20% (● e ×), Filtrado de cultura 10% e 20% (● e ×). (a) e (b) representam respectivamente a 3^o folha tratada e inoculada e a 4^o folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. *Seguido de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). PF: peso fresco.

4.4.3 Atividade de β -1,3-glucanase

A atividade da β -1,3-glucanase foi influenciada pelos tratamentos com extratos de *P. sanguineus*, na 3ª folha tratada, bem como na 4ª folha não tratada e inoculada, comprovando a sistemicidade do efeito também para essa enzima, como já observado em peroxidase e polifenoloxidase (Figura 8).

Na folha tratada, os extratos de basidiocarpo 10 e 20% reduziram a atividade da enzima em relação ao controle aos 5 DAI, e aos 7 DAI para o extrato a 20% quando comparado a água e ao fungicida.

O micélio a 10%, em relação a água, estimulou aos 3 DAI e inibiu aos 5 DAI. Ao passo que, o extrato a 20% inibiu a atividade da β -1,3-glucanase aos 3 DAI em comparação ao fungicida e aos 5 DAI em relação a água.

O extrato de filtrado de cultura a 10% não apresentou efeito significativo e a 20% foi relativamente menor que a água aos 5 DAI.

A 4ª folha não tratada apresentou efeitos semelhantes a 3ª folha sobre a atividade da β -1,3-glucanase, de forma ainda mais acentuada.

De acordo com Stangarlin et al. (2000), plantas de feijoeiro desafiadas com o hemibiotrófico *P. griseola* não alteraram a atividade de β -1,3-glucanase, ao passo que, quando desafiadas com o fungo biotrófico *Uromyces appendiculatus*, a indução da atividade de β -1,3-glucanase foi verificada (STANGARLIN & PASCHOLATI, 2000). Dessa forma, supõe-se que existe uma relação entre o tratamento eliciador e o patógeno desafiante, na ativação dos mecanismos de defesa em plantas. A planta poderia investir em compostos que normalmente ela ativaria na presença do patógeno, porém, com maior eficiência quando pré-disposta a um eliciador.

Cavalcanti et al. (2006) verificaram que acibenzolar-S-metil (ASM; 0,2 g L⁻¹), Ecolife (5 mL L⁻¹), suspensão de quitosana (MCp; 200 g L⁻¹) proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso*, e extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados por *C. pernicioso* (VLA; 300 g L⁻¹) conferem capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Essas substâncias promoveram o aumento na atividade de quitinase e β -1,3-glucanase, relacionadas à patogênese em folhas de plantas de tomateiro.

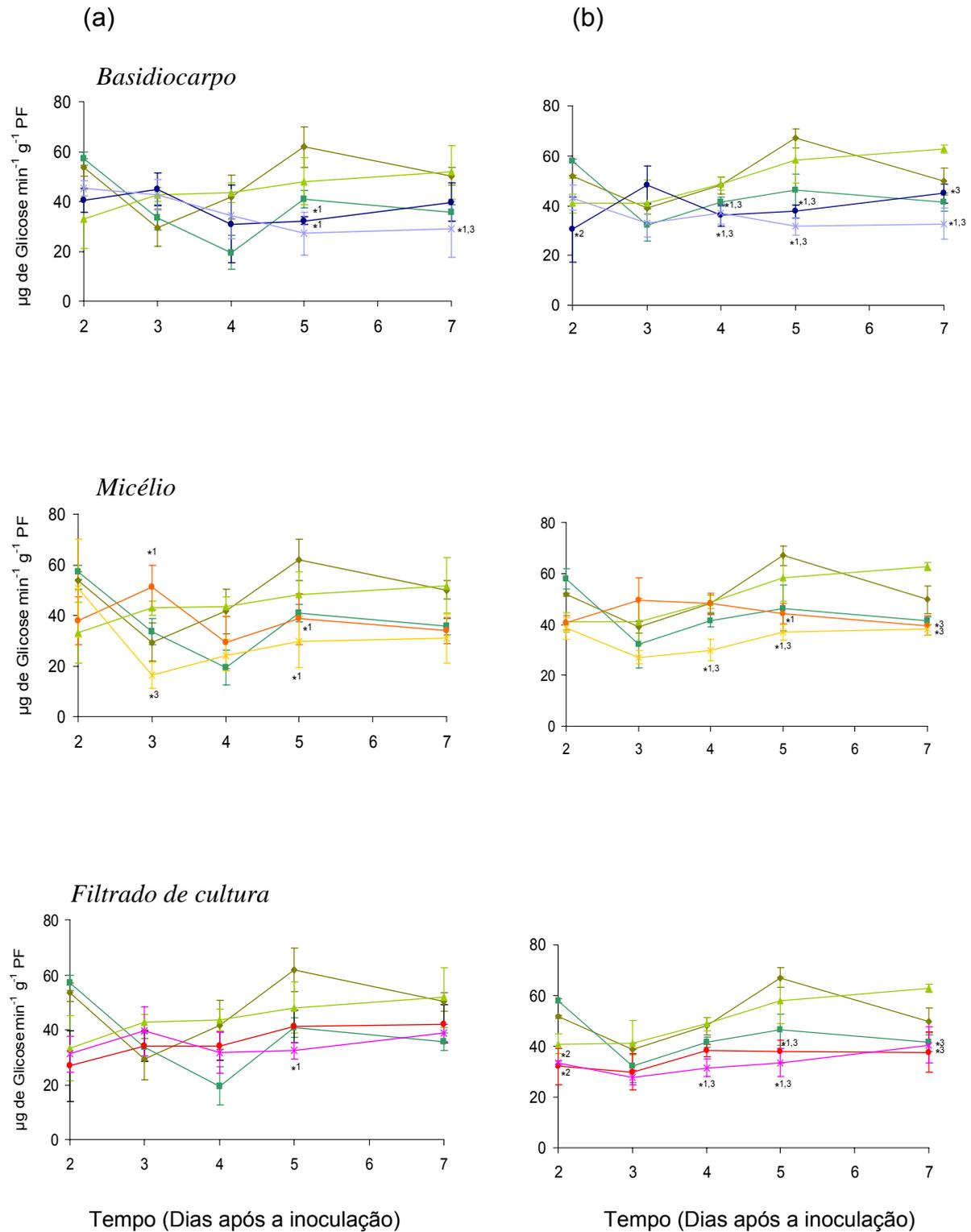


Figura 8 Atividade de β -1,3-glicanase em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após os tratamentos com os controles água (\diamond), Acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L^{-1}) (\blacksquare) e Fungicida (Azoxystrobin 40 mg i.a. L^{-1}) (\blacktriangle) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 10% e 20% (\bullet e \times), Micélio 10% e 20% (\circ e \times), Filtrado de cultura 10% e 20% (\bullet e \times). (a) e (b) representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média \pm o erro padrão. *Seguido de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). PF: peso fresco.

4.5 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

4.5.1 Teor de proteína

Na literatura são encontrados trabalhos que ressaltam o papel das proteínas nos mecanismos de resistência de plantas (PASCHOLATI & LEITE, 1995; MORAES, 1992). O teor de proteína foi significativamente alterado tanto na folha tratada como na folha não tratada com os extratos de *P. sanguineus* (Figura 9).

O extrato obtido de basidiocarpo a 10% foi significativo a partir do 4 DAI, estimulando o teor de proteínas em relação a água e ao fungicida. Aos 5 e 7 DAI o efeito foi superior a água e ao ASM. O basidiocarpo a 20% foi superior a água e ao fungicida (3 e 4 DAI) e aos 5 e 7 DAI maiores que os três controles.

O extrato de micélio estimulou a síntese protéica aos 4 DAI comparado aos três controles, e aos 5 e 7 DAI em relação a água e fungicida e a água, respectivamente. O extrato a 20% foi superior a água e ao fungicida (3 DAI), aos três controles (4 DAI), a água e ASM (5 DAI) e a água (7 DAI).

O filtrado de cultura a 10% foi superior aos três tratamentos controles aos 4 DAI, aos 5 DAI maior que a água a ASM e aos 7 DAI superior ao fungicida. O extrato a 20% foi inferior aos 3 DAI em relação ao ASM, com posterior aumento aos 4 DAI comparado a água e fungicida e aos três controles aos 5 e 7 DAI.

O efeito dos extratos de *P. sanguineus* sobre o teor de proteínas é semelhante no 4º trifólio não tratado. Verifica-se neste uma resposta mais rápida na síntese protéica, considerando-se que houve diferença significativa aos 2 DAI, não sendo verificado esse efeito na 3ª folha, podendo estar relacionado a idade da mesma, a qual, no momento da aplicação dos tratamentos e inoculação do patógeno, encontrava-se com 50% de área foliar e com provável atividade fisiológica alta, otimizando a síntese de proteínas.

No geral, verifica-se uma alteração significativa no conteúdo protéico, dessa forma, quando as enzimas investigadas nesse estudo eram divididas pelo conteúdo protéico, o resultado era uma redução drástica das mesmas, ao passo que, quando expressadas pelo peso das amostras, um resultado satisfatório era verificado. Assim, mantiveram-se as enzimas citadas acima (peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase) apresentadas pelo peso das amostras vegetais.

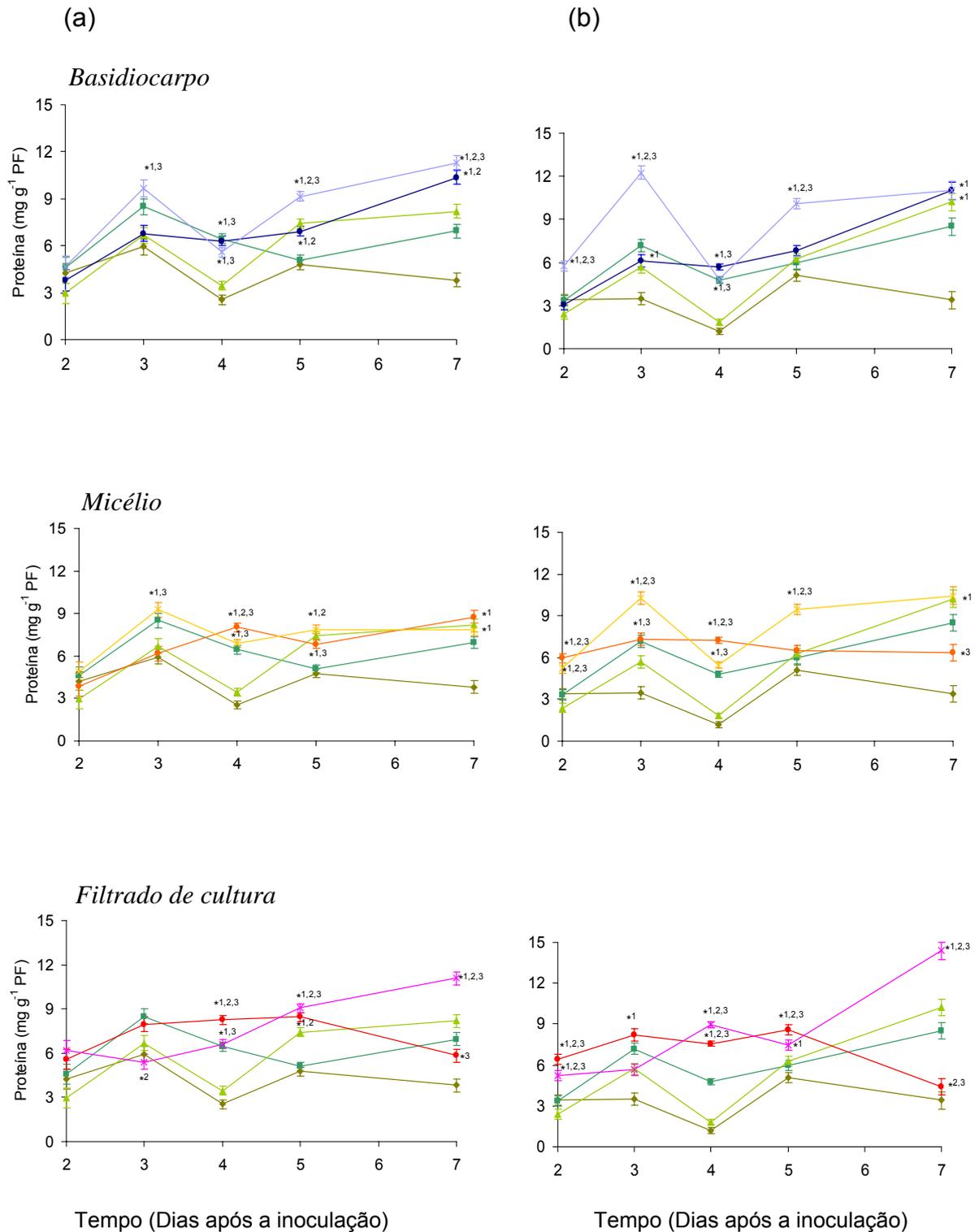


Figura 9 Teor de proteína em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após os tratamentos com os controles água (♦), Acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L^{-1}) (■) e Fungicida (Azoxyestrobina 40 mg i.a. L^{-1}) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 10% e 20% (● e ×), Micélio 10% e 20% (○ e ×), Filtrado de cultura 10% e 20% (● e ×). (a) e (b) representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média \pm o erro padrão. *Seguido de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). PF: peso fresco.

4.5.2 Teor de clorofila a

O teor de clorofila a nas plantas que receberam os extratos de *P. sanguineus* apresentou-se alterado, como pode ser observado na Figura 10. No extrato de basidiocarpo 10% verifica-se aumento no conteúdo de clorofila a, na 3ª folha tratada, quando comparado a água (3, 4 e 7 DAI), ao ASM (5 e 7 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI). Incremento também verificado no extrato a 20% e relação à água (3 e 7 DAI), ao ASM (2, 3, 4 e 5 DAI) e ao fungicida (2, 4 e 7 DAI).

O extrato de micélio a 10% reduziu o teor de clorofila a aos 2 e 5 DAI, em relação ao ASM, e a água e fungicida, respectivamente. Porém, aumentos significativos são verificados em comparação com a água (3, 4 e 7 DAI), ao ASM (3, 4 e 7 DAI) e ao fungicida (4 DAI). O mesmo extrato na maior concentração apresentou resultados superiores a água (3, 4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI).

O filtrado de cultura 10% aumentou o conteúdo de clorofila a em relação à água (2, 3, 4 e 7 DAI), ao ASM (3 e 5 DAI) e ao fungicida (2, 3 e 7 DAI). O extrato a 20% foi maior quando comparado a água (4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI), porém inibições são observadas em relação a água (5 DAI), ao ASM (3 DAI) e ao fungicida (3 e 5 DAI).

A 4ª folha não tratada apresentou um padrão de respostas semelhante a folha tratada, demonstrando que os extratos agiram de forma sistêmica também para essa variável.

Trabalho realizado por Stangarlin et al. (2000) com plantas de feijoeiro inoculadas com *P. griseola*, demonstram reduções significativas no teores de clorofila a e b nas áreas verdes, próximas as regiões infectadas, em cultivar moderadamente suscetível. Esse efeito não foi verificado quando se utilizou uma cultivar altamente suscetível.

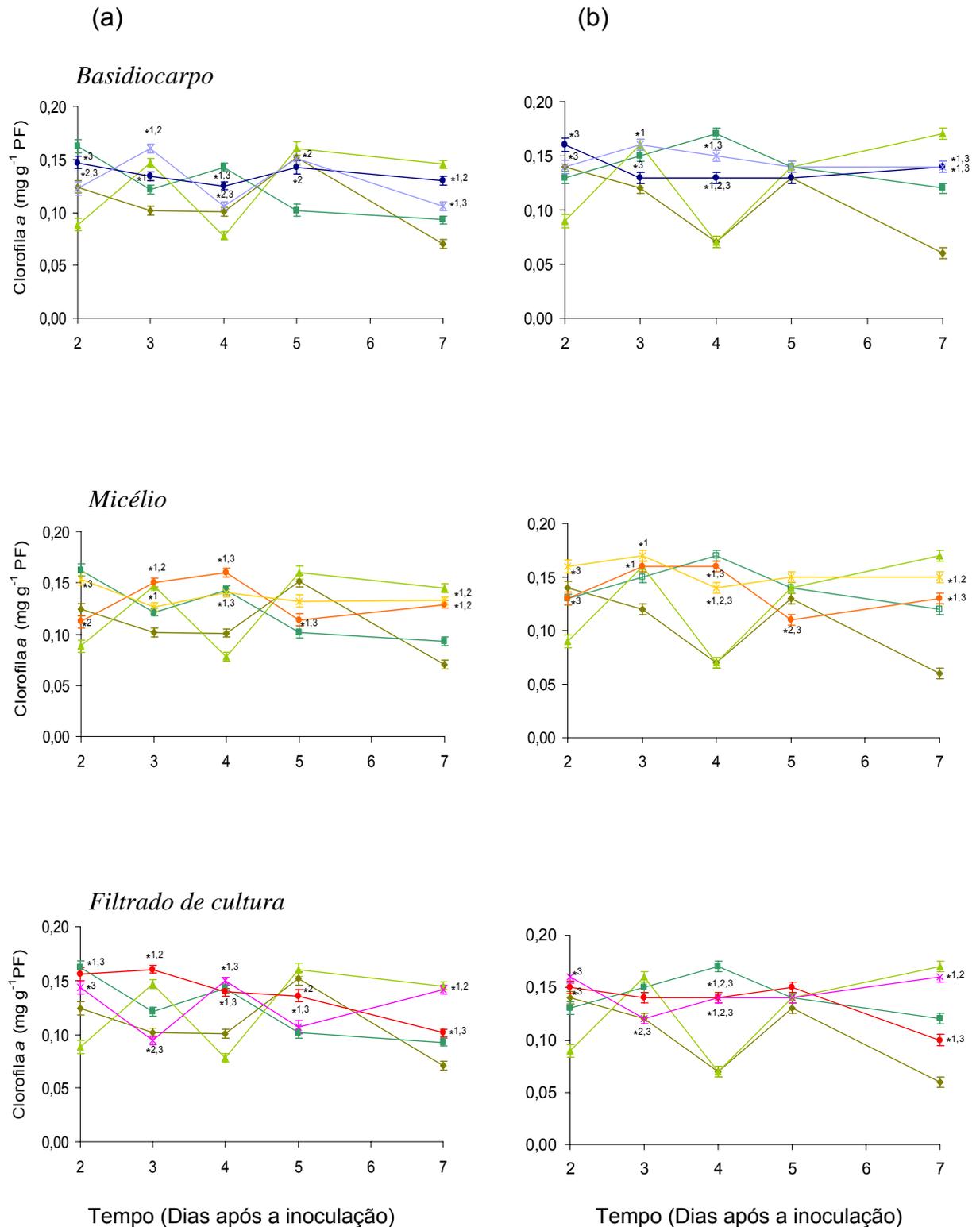


Figura 10 Teor de clorofila a em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após os tratamentos com os controles água (♦), Acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L⁻¹) (■) e Fungicida (Azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 10% e 20% (● e ×), Micélio 10% e 20% (○ e ×), Filtrado de cultura 10% e 20% (● e ×). (a) e (b) representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. *Seguido de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). PF: peso fresco.

4.5.3 Teor de clorofila *b*

O teor de clorofila *b* nas plantas de feijoeiro que receberam os extratos apresentaram-se alteradas, conforme Figura 11. Na 3ª folha tratada, o extrato de basidiocarpo 10% ocasionou um estímulo no teor de clorofila *b*, em relação aos controles água (7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 DAI). Incrementos foram verificados no extrato a 20% e relação à água (3 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 DAI). Houve reduções aos 2 e 7 DAI quando comparado ao ASM e ao fungicida, respectivamente.

O extrato aquoso obtido de micélio a 10% reduziu o teor de clorofila *b* aos 2 DAI, em relação ao ASM. Porém, aumentos significativos são verificados em comparação com a água (3, 4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (4 DAI). O micélio a 20% apresentou resultados superiores a água (4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2, 4 e 7 DAI).

O filtrado de cultura a 10% aumentou o conteúdo de clorofila *a* em relação à água (3, 4 e 7 DAI), ao ASM (3 e 7 DAI) e ao fungicida (2, 3 e 4 DAI) e inibiu quando comparado ao fungicida, 7 dias após a inoculação. O extrato a 20% foi maior quando comparado a água (4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI), porém inibições são observadas em relação ao ASM e ao fungicida aos 3 dias após a inoculação.

A 4ª folha não tratada apresentou um efeito semelhante a folha tratada, demonstrando que os extratos agiram de forma sistêmica também para a clorofila *b*.

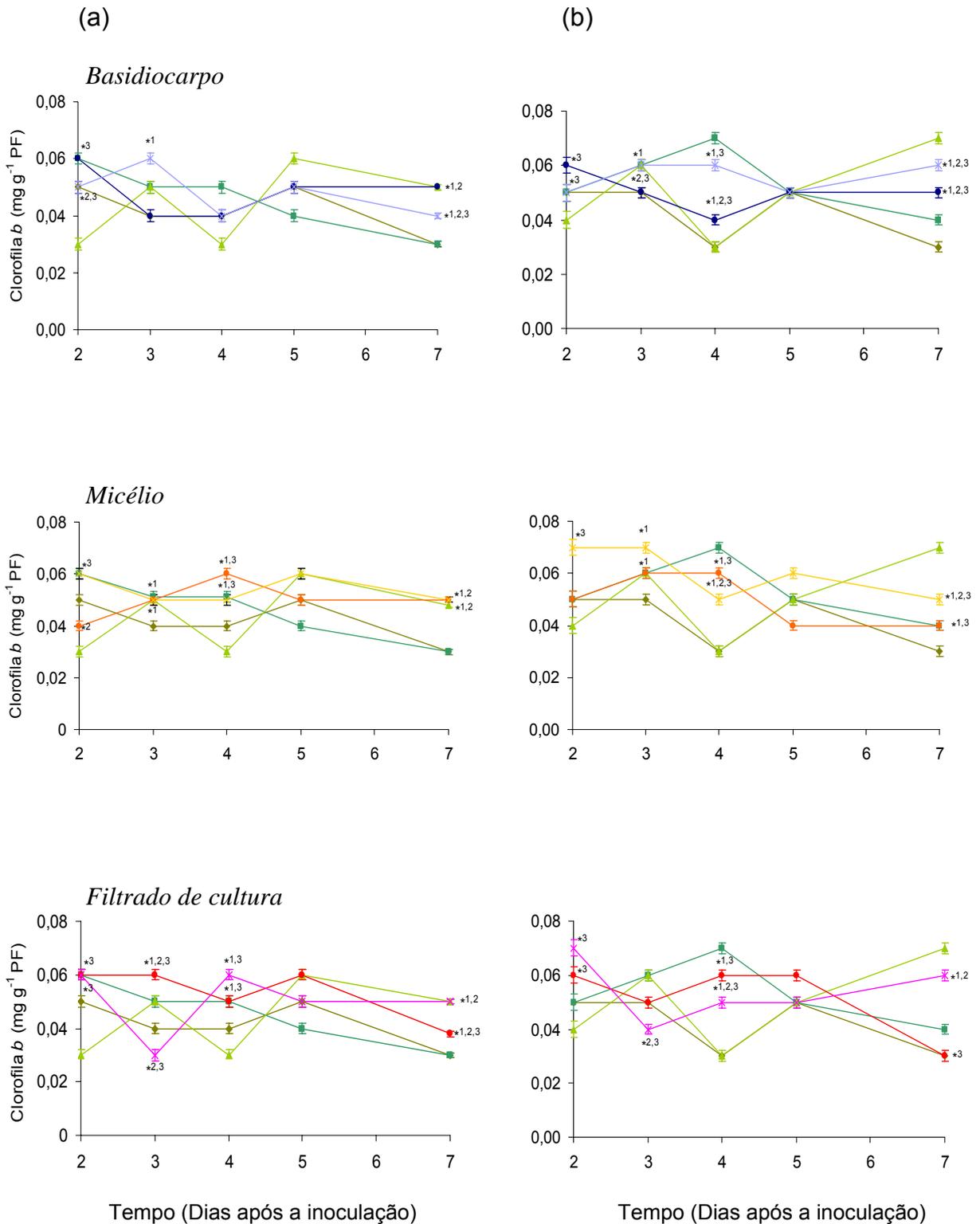


Figura 11 Teor de clorofila *b* em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após os tratamentos com os controles água (♦), Acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L⁻¹) (■) e Fungicida (Azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 10% e 20% (● e ×), Micélio 10% e 20% (○ e ×), Filtrado de cultura 10% e 20% (● e ×). (a) e (b) representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. *Seguido de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). PF: peso fresco.

4.5.4 Teor de clorofila total

O conteúdo de clorofila total em plantas de feijoeiro tratadas com extratos aquosos de *P. sanguineus* e desafiadas com *P. griseola* pode ser visualizado na Figura 12.

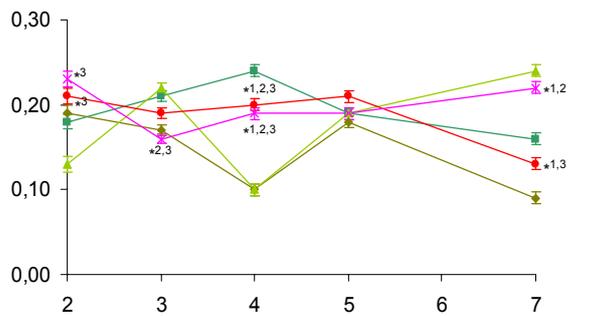
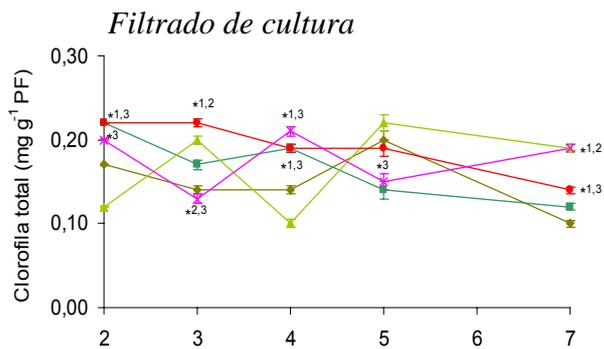
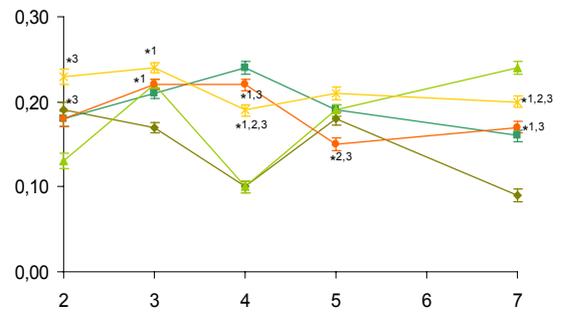
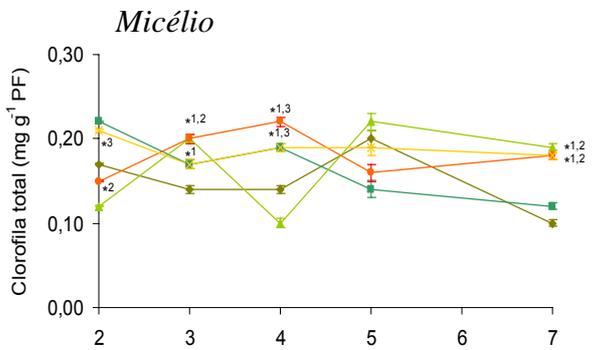
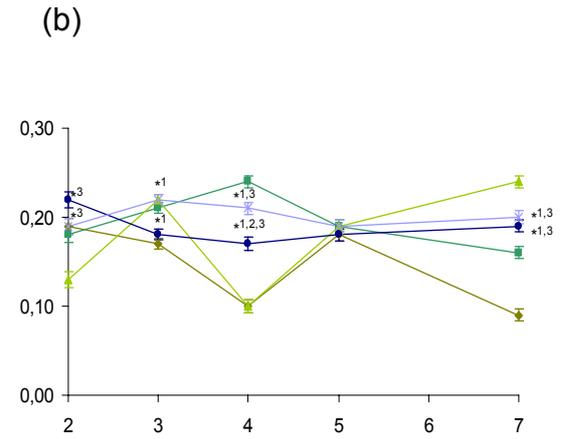
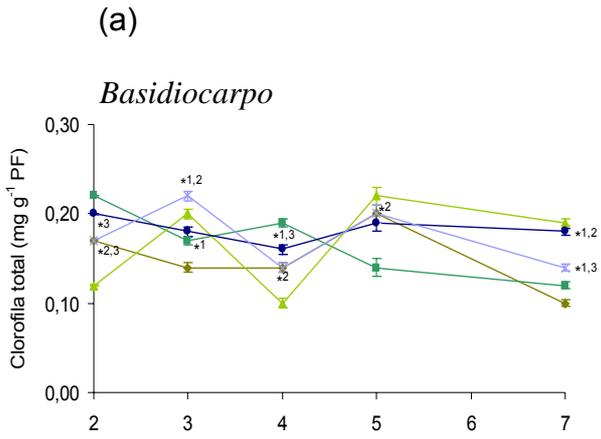
O extrato obtido de basidiocarpo 10% estimulou o conteúdo de clorofila total em relação aos controles água (3, 4 e 7 DAI), ASM (5 e 7 DAI) e fungicida (2 e 4 DAI). Alterações também são observadas no extrato a 20%, com aumento quando comparados a água (3 e 7 DAI), ASM (3 e 5 DAI) e ao fungicida (2 DAI), e reduções em relação ao ASM (2 e 4 DAI) e ao fungicida (7 DAI).

O micélio 10% reduziu o teor de total de clorofila aos 2 DAI, em relação ao ASM. Porém, aumentos significativos são verificados em comparação com a água (3, 4 e 7 DAI), ao ASM (3 e 7 DAI) e ao fungicida (4 DAI). O micélio a 20% apresentou resultados superiores a água (3, 4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI).

Filtrado de cultura a 10% aumentou o conteúdo de clorofila em relação à água (2, 3, 4 e 7 DAI), ASM (3 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI) e inibiu quando comparado ao fungicida aos 7 dias após a inoculação. O extrato a 20% foi maior quando comparado a água (4 e 7 DAI), ao ASM (7 DAI) e ao fungicida (2 e 4 DAI), porém inibições são observadas em relação ao ASM e ao fungicida aos 3 DAI e apenas ao ASM 5 dias após a inoculação.

Verifica-se um comportamento semelhante dos dados na 4ª folha não tratada, ressaltando o efeito sistêmico de *P. sanguineus* sobre o conteúdo de clorofila total em feijoeiro. Esses resultados sugerem a necessidade de produção de energia para síntese dos compostos de defesa da planta, considerando-se que as moléculas de clorofila *a* e *b* constituem os dois sistemas de pigmentos responsáveis pela absorção e transferência de energia radiante (FERRI, 2004).

Na literatura há poucos trabalhos que verificam o teor de clorofila em plantas tratadas com indutores e/ou desafiadas com um patógeno. Stangarlin & Pascholati (2000) verificaram incremento no teor de clorofila em regiões infectadas com *Uromyces appendiculatus*, o que ocorre tanto na cultivar de feijoeiro moderadamente suscetível como altamente suscetível.



Tempo (Dias após a inoculação)

Tempo (Dias após a inoculação)

Figura 12 Teor de clorofila total em plantas de feijoeiro inoculadas com *Pseudocercospora griseola* três dias após os tratamentos com os controles água (◆), Acibenzolar-S-metil (ASM 75 mg i.a. L⁻¹) (■) e Fungicida (Azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) (▲) e os extratos aquosos de *Pycnoporus sanguineus* obtidos do basidiocarpo a 10% e 20% (● e ×), Micélio 10% e 20% (○ e ×), Filtrado de cultura 10% e 20% (● e ×). (a) e (b) representam respectivamente a 3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha apenas inoculada. Barras indicam a média ± o erro padrão. *Seguido de número indica diferença estatística a 5% pelo teste de Dunnett's quando comparada aos controles água (1), ASM (2) e Fungicida (3). PF: peso fresco.

5 CONCLUSÕES

Os extratos obtidos de *P. sanguineus* controlaram a mancha angular do feijoeiro causada por *P. griseola*.

O extrato não autoclavado obtido de micélio de *P. sanguineus* apresentou atividade antimicrobiana direta, inibindo a germinação de esporos, crescimento micelial e espoulção de *P. griseola*.

A indução de enzimas de defesa de resistência local e sistêmica, como peroxidase e polifenoloxidase, foram superiores nas plantas tratadas com os extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura de *P. sanguineus*. Efeito contrário foi verificado na atividade de β-1,3-glucanase.

Alterações fisiológicas como o teor de proteínas e clorofilas foram alteradas acentuadamente nas plantas de feijoeiro tratadas com os extratos, indicando a necessidade de energia para síntese de compostos de defesa.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press. p.207-248, 2005.

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

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. **Plant Physiology**. v.24, p.1-15, 1949.

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.). Dissertação Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 51 p. 2005.

BENINCA, C.P. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Dissertação Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 45 p. 2007.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.(Eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. 4^a edição. São Paulo: Ceres, p.333-349, 2005.

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

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa/MG: Editora UFV, p.13-18, 2006.

BORÉM, A.; PETERNELLI, L.A. **Hibridização artificial em soja e feijão**. Viçosa: Editora UFV, 43p, 1997.

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.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 532p. 1990.

CARNEIRO, S.M.T.P.G.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de dano provocado pela mancha angular em feijoeiro: relação entre severidade, área foliar e componentes de produção. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.427-431, 1997.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 81-124, 2005a.

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, 263p. 2005b.

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

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, p. 461-466, 1996.

CORNELISSEN, B.J.C.; MELCHERS, L.S. strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p.709-712, 1993.

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.

DI PIERO, M. R.; PASCHOLATI, S. F. Efeito das cianobacterias *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.

DI PIERO, R.M.; GARCIA JR.D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. 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, p. 29-50, 2005.

DOUNGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, p.351-359, 1999.

FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**, 2ªed. São Paulo: Editora EPU, 362p, 2004.

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 recôndita* f. sp *tritici* e na indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 112 p. 2003.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, G.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorat*. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 25, no. 2, p. 503-507, 2003.

FRIC, F. Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, P. H. (ed.). **Physiological Plant Pathology**, Berlin, Springer, p. 617-631, 1976.

GASPAR, T. H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980**. Geneva, Universidade de Geneva, Centro de Botanique, 324 p. 1982.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000.

GODOY, C.V.; CARNEIRO, S.M.T.P.G; IMAUTI, M.T.; DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGER, R.D.; BERGAMIN FILHO, A. Diagrammatic scales dor bean diseases: development and validation. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.104, n.4, p.336-345, 1997.

GUZZO, S.D., HARAKAVA, R., KIDA, K., MARTINS, E.M.F., ROVERATTI, D.S. Proteção de cafeeiros contra *Hemileia vastatrix* por cloreto de benzalcônio (composto de amônio quaternário). **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 339-345, 1999.

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. In: LUZ, W.C. (Eds.) **Revisão Anual de Patologias de Plantas**, v.11, p.283-332, 2003.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.) **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, p.177-199, 1997.

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 Phatology**, v.45, p.631-635, 1996.

IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 88p. 2007.

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.

JESUS JR, W.C.; ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; PEREIRA, J.L.A. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.293, 1999. [Abstract]

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452p. 2004.

KIMATI, H Controle Químico. In: BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: ceres, 1995.

KUC, J. **Systemic induced resistance**. Aspects of Applied Biology, Dundee, v. 42,p. 235-242, 1995.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. Tese de doutorado: ESALQ, 140p, 2007.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000.

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

MARQUES, C.J.S. Atividades biológicas de produtos naturais e sintéticos Estudo das atividades antibacteriana, antiparasitária e antiviral de extratos, frações e substâncias puras obtidas de plantas, fungos e animais, bem como de substâncias sintéticas. Dissertação Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, 64p. 2001.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdam, v.162, p.491-498, 2002.

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

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.

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.

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: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, p.417-454, 1995.

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

PEGLER, D.N. Poroid Families of the Aphylophorales. In: AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A. **The fungi an advanced treatise**. Academic Press: New York, p. 402-409, 1973.

PÉREZ-SILVA, E.; AGUIRRE-ACOSTA, E.; PÉREZ-AMADOR, C.; Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (*Polyporaceae*) en México. **Rev. Mex. Mic.** 4:137-177, 1988.

RAVEN, P; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003

RODRIGUES, F. A.; FERNANDES, J. J.; MARTINS, M. Influência de semeaduras sucessivas de feijoeiro na severidade da mancha-angular e ferrugem e perdas na produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, vol.34 n.8, 1999.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas: Fundamentos**. Viçosa: UFV, 269p. 2007.

SAITO, M. L; LUCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna: Embrapa, 1998.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, S. A.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J.

O. (Ed.) **A cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fósforo, p. 669-722, 1996.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.3, p.247-251, 1992.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos de óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. 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, p.125-138, 2005.

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.54-56, 2003.

SILVA, M.B.C; CASTRO, N.F; CAVALCANTI, M.A. **O Potencial Biotecnológico de Fungos Que Causam a Podridão da Madeira**. In: 54º Congresso Nacional de Botânica. 3ª Reunião Amazônica de Botânica. Anais eletrônicos (CD-ROM) Universidade da Amazônia – Unama - 13 a 18 de Julho de 2003, Belém - Ananindeua – Pará.

SMÂNIA, A.; MONACHE FD.; SMANIA E.F.; GIL M.L.; BENCHETRIT L.C.; CRUZ F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.177-81, 1995.

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

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

STANGARLIN, J.R.; SCWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 1999.

STANGARLIN, J.R., PASCHOLATI, S.F; LABATE, C; A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 59-66, 2000.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.34-42, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4ª ed. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts, 794p. 2006.

VALE, F.X.R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum: doenças da parte aérea causada por fungos. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, v.1, p.341-350, 1997.

VAN LON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families os pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, p.85-97, 1999.

VIEIRA, L.C.; HEMP, S. Taxonomia e morfologia do feijoeiro. In: **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis:EPAGRI, 285p. 1992

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.

WATANABE, R. A. M.; JÚNIOR, H. M. O.;GARCIA, T. A.; SANTIAGO M. F. **Tratamento do efluente da indústria farmacêutica com os fungos selecionados: *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor***. In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG - Conpeex, 2., 2005, Goiânia. Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005.